

Passo a Passo para o Uso do Cromatógrafo Gasoso Modelo GC-CP3800 Varian para Análises de Gases de Efeito Estufa (GEEs)



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 403

Passo a Passo para o Uso do Cromatógrafo Gasoso Modelo GC-CP3800 Varian para Análises de Gases de Efeito Estufa (GEEs)

Juliana Feitosa Felizzola

Cristiane Formigosa Gadelha da Costa

Steel Silva Vasconcelos

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.
Caixa Postal 48. CEP 66095-903 - Belém, PA.
Fone: (91) 3204-1000
Fax: (91) 3276-9845
www.cpatu.embrapa.br
cpatu.sac@embrapa.br

Comitê Local de Publicação

Presidente: *Silvio Brienza Júnior*
Secretário-Executivo: *Moacyr Bernardino Dias-Filho*
Membros: *José Edmar Urano de Carvalho*
Márcia Mascarenhas Grise
Orlando dos Santos Watrin
Regina Alves Rodrigues
Rosana Cavalcante de Oliveira

Revisão técnica:

Adriana Hadad – PUC/RJ

Flávia Vieira – UFRJ

Sônia Letichevsky – Instituto Nacional de Tecnologia

Supervisão editorial: *Luciane Chedid Melo Borges*

Revisão de texto: *Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana*

Normalização bibliográfica: *Luiza de Marillac P. Braga Gonçalves*

Editoração eletrônica: *Euclides Pereira dos Santos Filho*

Foto da capa: *Juliana Feitosa Felizzola*

1ª edição

Versão eletrônica (2014)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Amazônia Oriental

Felizzola, Juliana Feitosa

Passo a passo para uso do cromatógrafo gasoso modelo GC-CP3800 variando para análises de gases de efeito estufa (GEEs) / Juliana Feitosa Felizzola, Cristiane Formigosa Gadelha da Costa, Steel Silva Vasconcelos. - Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

68 p. : il. color. ; 22 cm x 15 cm (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513 ; 403)

1. Cromatografia gasosa. 2. Cromatógrafo gasoso – Segurança. 3. Cromatógrafo GC-CP3800. 4. Equipamento de proteção individual (EPI). I. Costa, Cristiane Formigosa Gadelha da. II. Vasconcelos, Steel Silva. III. Título. IV. Série.

CDD 543.0896 21. ed.

Autores

Juliana Feitosa Felizzola

Nutricionista, doutora em Química Ambiental e Analítica, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

juliana.felizzola@embrapa.br

Cristiane Formigosa Gadelha da Costa

Engenheira-agrônoma, mestre em Ciências Florestais, bolsista da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

cristianeformigosa@yahoo.com.br

Steel Silva Vasconcelos

Engenheiro-agrônomo, doutor em Recursos e Conservação Florestais, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

steel.vasconcelos@embrapa.br

Apresentação

O documento apresentado tem o objetivo de mostrar detalhadamente as etapas de análise no cromatógrafo gasoso GC-CP3800 Varian, para que pesquisadores, alunos e estagiários possam utilizar a metodologia de análise de forma rotineira e obtenham resultados precisos e de boa qualidade para as pesquisas relacionadas a gases de efeito estufa (GEEs).

Erros de rotina são mostrados neste trabalho e suas correções e origens são discutidas para análises de metano e óxido nitroso, desde a injeção das amostras gasosas até a obtenção de cromatogramas e interpretação de resultados.

Os autores lançaram esta publicação enfatizando todos os aspectos técnicos para o funcionamento perfeito do cromatógrafo gasoso GC-CP3800 Varian.

Adriano Venturieri

Chefe-Geral da Embrapa Amazônia Oriental

Sumário

Passo a Passo para o Uso do Cromatógrafo Gasoso Modelo GC-CP3800 Varian para Análises de Gases de Efeito Estufa (GEEs)	9
Introdução	9
Princípio da cromatografia gasosa (CG) com detector de chama (FID) e detector de captura de elétrons (ECD)	10
O cromatógrafo GC-CP3800 Varian	11
Sugestão de preparação de amostras	16
Revisão do software Varian CP3800	16
Perigos em potencial	19
Equipamentos de proteção individual (EPIs)	19
Procedimentos em caso de acidentes	19
Protocolo de uso	20
Resultados analíticos	47
Outras funções que podem ser alteradas ou monitoradas	56
Cálculos de concentração no Excel	62
Possíveis problemas	64
Procedimentos de segurança importantes antes da coleta	65
Coleta de amostras em campo	68

Passo a Passo para o Uso do Cromatógrafo Gasoso Modelo GC-CP3800 Varian para Análises de Gases de Efeito Estufa (GEEs)

Juliana Feitosa Felizzola

Cristiane Formigosa Gadelha da Costa

Steel Silva Vasconcelos

Introdução

Este guia esclarece o uso da cromatografia gasosa no GC-CP3800 Varian para análise de variáveis associadas aos processos de emissão de gases de efeito estufa (GEEs). Os procedimentos destinam-se à avaliação do fluxo de metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) e gás carbônico (CO_2) nas diversas matrizes ambientais: gases emitidos pelo solo, gases presentes na água e no ar.

A descrição e os procedimentos a seguir englobam linhas de estudo como a emissão de GEE em sistemas agropecuários, o balanço das emissões de GEE e a determinação de fatores de emissão, também para as áreas de produção de grãos, sendo considerada a utilização do mesmo equipamento.

Neste documento é estabelecido um procedimento de operação padrão (POP) que não é considerado como um substituto do manual do equipamento GC-CP3800. Estudantes e a equipe técnica devem ser treinados pelos supervisores de operação e as metodologias de uso devem ser documentadas. Esse POP tem o objetivo de promover o uso seguro do GC-CP3800 para fins de pesquisa, levando em consideração cuidados como o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), procedimentos em caso de acidentes e operação do Varian GC-CP3800.

Princípio da cromatografia gasosa (CG) com detector de chama (FID) e detector de captura de elétrons (ECD)

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de separação e análise de misturas por interação dos seus componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. De forma geral a técnica de CG é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes sejam voláteis e que sejam termicamente estáveis.

A fase móvel em CG não interage com a amostra, apenas a carrega através da coluna, sendo assim usualmente referida como gás de arraste. Este deve ser inerte e não deve reagir com a amostra, fase estacionária ou superfícies do instrumento. Além disso, deve ser isento de impurezas que possam degradar a fase estacionária.

A amostra é injetada (injetor de amostra) e arrastada pela fase móvel (gás de arraste) através da coluna que contém a fase estacionária (coluna CG aquecida), na qual ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas saem da coluna carregadas pela fase móvel e passam por um detector que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de substâncias separadas na coluna.

A função do detector situado na saída da coluna de separação é medir os componentes separados presentes no gás de arraste que eflui da coluna. O sinal de saída do detector entra num registrador que gera o cromatograma. Os dois detectores de ionização amplamente utilizados são: o detector de ionização de chama (FID) e o detector de captura de elétrons (ECD). A base do detector de ionização de chama é a de que o efluente da coluna, misturado com hidrogênio e ar, produz uma chama com energia suficiente para ionizar as moléculas do composto que tenham potenciais de ionização baixos. Os íons assim produzidos são coletados por eletrodos e a corrente iônica resultante é medida, ou seja, a detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. O FID é útil para análises de amostras orgânicas contaminadas com água, óxido de nitrogênio e

enxofre e exibe sensibilidade alta ($\sim 10^{-3} \text{ s. s}^{-1}$), larga faixa linear de resposta ($\sim 10^7$), além de possuir baixo custo e baixo ruído. No ECD, a amostra eluída da coluna passa sobre uma fonte radioativa emissora B, geralmente Ni^{63} . Um elétron do emissor causa a ionização do gás carreador (frequentemente nitrogênio) e há produção de uma rajada de elétrons. Na ausência de espécies orgânicas, produz-se uma corrente constante entre o par de eletrodos em decorrência desse processo de ionização. Contudo, a corrente decresce na presença de moléculas orgânicas que contêm grupos funcionais eletronegativos que tendem a capturar elétrons, como os compostos halogenados, quinonas e grupos nitro que são detectados com alta sensibilidade. Esse detector é insensível a grupos funcionais como aminas, alcoóis e hidrocarbonetos.

Desvios e oscilações (identificados por meio do ruído do cromatograma) na linha base podem ser causados por problemas eletrônicos, impurezas e sujeiras nos gases e no detector.

O cromatógrafo GC-CP3800 Varian

Os principais componentes de um GC incluem: gases de arraste e gases para o detector, controladores de fluxos e válvulas, porta de injeção, coluna, forno, detector e um registrador de dados, como mostra a Figura 1.

Gases de arraste e gases para detectores

A fase móvel é composta por um gás inerte que passa pelo injetor e transporta os componentes da amostra para a coluna. O gás carreador frequentemente usado é o hélio, entretanto nitrogênio, argônio e ainda hidrogênio podem ser usados. A seleção do gás de arraste dependerá do tipo de detector, das características da coluna, da matriz da amostra, de condições de segurança e do custo. Se forem usadas colunas capilares, os gases mais utilizados são o hélio e o hidrogênio, que proporcionam alta eficiência em diferentes fluxos de gás programados. Se forem usadas colunas empacotadas, com o uso de nitrogênio é possível obter alta eficiência com baixos fluxos.

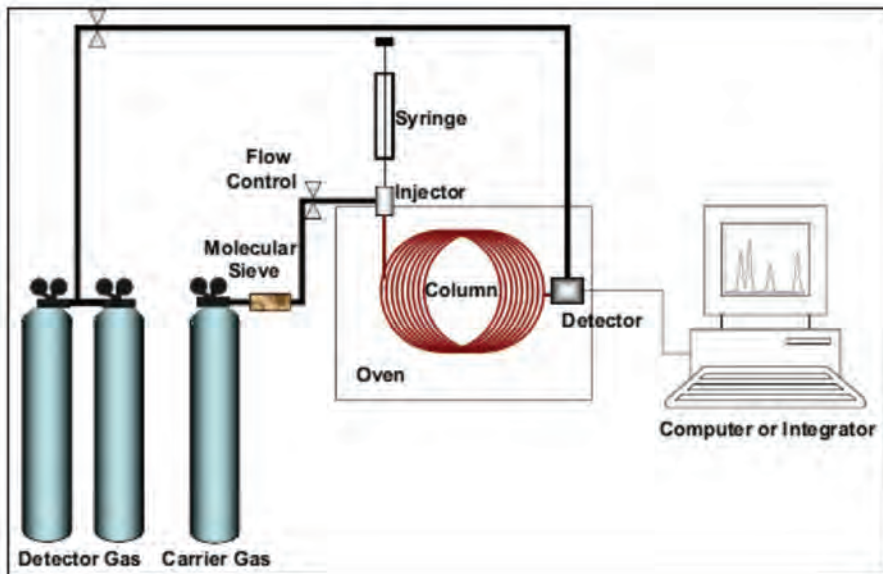


Figura 1. Cromatógrafo gasoso.

Injetores

Existem duas classes de injetores: os de vaporização e os de injeção direta na coluna, os chamados **on-column**. Os injetores de vaporização podem ser do tipo **split**, **splitless** ou **direct**, e os injetores **on-column**, os do tipo injeção direta na coluna e injeção resfriada **cooled**. A função dos injetores é depositar as amostras dentro da coluna de forma homogênea para que se obtenham bandas finas e com uma boa discriminação entre os componentes da amostra. Os injetores **split** e **splitless** são aquecidos de forma que causam a vaporização das amostras antes de entrar na coluna. As temperaturas dos injetores são geralmente ajustadas para 50 °C acima do ponto de ebulição do composto menos volátil da mistura. Os modos **split/splitless** determinam a quantidade de amostra que entra na coluna, de modo que o **splitless** é tipicamente usado para análises traço e transfere toda a quantidade de amostra para coluna, enquanto o **split** elimina para fora do injetor uma porção de amostra pré-determinada através do **split vent** e a outra porção para dentro

da coluna. O injetor em modo **split** permite a entrada de amostras em concentrações que variam de 0,1-10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ sem a saturação da coluna. A velocidade de injeção deverá ser rápida no modo **split** e lenta no modo **splitless**.

Em injetores **on-column**, amostras líquidas entram diretamente na coluna ou passam pela sílica desativada chamada **retention gap**. As amostras são vaporizadas de acordo com o aumento da temperatura do injetor. Injetores **on-column** a frio são ideais para amostras sensíveis a calor ou amostras que tem grandes diferenças no processo de vaporização de injetores. Injeções diretas são feitas em colunas com grandes diâmetros (0,45 mm a 0,53 mm).

A maioria dos injetores tem um aparato chamado **liner**, que fica dentro do injetor e protege o corpo do injetor dos diversos tipos de amostras, mistura amostras e afeta a quantidade de amostras a ser injetada na coluna.

Colunas

As colunas mais utilizadas em cromatografia gasosa são as colunas capilares de sílica fundida, que contém dentro uma fina camada de fase estacionária quimicamente ligada e poliamida na superfície externa para proteção. A escolha da coluna dependerá dos componentes da amostra, do tempo de vida da coluna e do custo.

Os componentes das amostras são primeiramente separados pela volatilidade do composto e temperatura estipulada. A fase estacionária deve ser estável acima de temperaturas requeridas para a separação. A maioria das colunas pode ser operada a temperaturas acima de 350 °C por um período curto ou a 325 °C por período longo. Baixas temperaturas promovem boa separação, mas proporcionam tempos longos de corrida cromatográfica e largos picos. A temperatura do forno é progressivamente aumentada para liberar os compostos menos voláteis.

A polaridade da coluna determina a capacidade de separar componentes polares e apolares. Fases estacionárias mais polares reterão compostos mais polares e fases apolares são conhecidas como mais estáveis e de longa vida, como as de 100% de metilpolisiloxano. A seletividade da coluna influencia a separação baseada em forças intermoleculares como as de dispersão, dipolo e ligações de hidrogênio. As forças de dispersão são aquelas que influenciam primeiramente em todas as fases estacionárias: pequenas moléculas e moléculas com baixa solubilidade tem baixa retenção em decorrência da dispersão.

Fases estacionárias são compostas de material constituído de polisiloxanos com metil, fenil, cianopropil ou trifloropropil. Os polisiloxanos que podem ser substituídos nas colunas são mais robustos e geralmente têm tempo de vida útil longo. Colunas constituídas de polisiloxanos modificados com arileno não são robustas, mas nelas ocorrem menos sangramentos (danos na estrutura química das colunas) e são ideais para serem usadas com espectrômetro de massas. Colunas constituídas com polietileno glicol (**PEG**) são conhecidas por separarem compostos em misturas difíceis, mas são facilmente degradáveis. Colunas com abertura tubular e camadas porosas (**Plot**) são apropriadas para análises de gases na temperatura ambiente. Fases estacionárias também podem ser ligadas ou não ligadas: as fases ligadas são mais estáveis e preferidas.

As colunas podem ter mais de 100 m de comprimento, com diâmetro entre 0,1 mm e 5 mm. Colunas longas com diâmetro pequeno proporcionam melhor resolução com custo mais alto do que colunas pequenas.

Todas as fases estacionárias são degradadas quando expostas ao oxigênio e a altas temperaturas, entretanto algumas são mais sensíveis que outras. A exposição mínima deve ser mantida, garantindo um fluxo de alta pureza de gás hélio.

Detectores

O cromatógrafo gasoso pode ser equipado com diferentes detectores, dois detectores ou mais com mais de uma coluna. Os diferentes detectores utilizados em cromatografia gasosa estão listados na Tabela abaixo.

Tabela 1. Tipos de detectores.

Detector	Seletividade	Limite de detecção	Faixa de concentração
Ionização de Chama (FID)	Compostos orgânicos	100 pg	10 ⁷
Condutividade Térmica (TCD)	Detector universal para compostos não orgânicos	1 ng	10 ⁷
Captura de elétrons (ECD)	Haletos, nitratos, nitritos, peróxidos, anidros, organometálicos	50 fg	10 ⁵
Nitrogênio-fósforo	Nitrogênio, fósforo	10 pg	10 ⁶
Fotometria de Chama (FPD)	Enxofre, fósforo, estanho, boro, arsênico, germânio, selênio, cromo	100 pg	10 ³
Fotoionização (PID)	Alifáticos, aromáticos, cetonas, ésteres, aldeídos, aminas, heterocíclicos, organosulfúricos, organometálicos	2 pg	10 ⁷
Espectrômetro de massa (MS)	Detector universal para compostos ionizáveis	fg levels	10 ⁷

Fonte: Manual CP3800 Varian.

Sugestão de preparação de amostras

Padrões de calibração

O sinal produzido pelo detector é único para cada composto e deve ser comparado com padrão conhecido para identificação e quantificação. Padrões de calibração devem ser usados e injetados como as primeiras injeções do dia e antes de cada batelada de amostras. A menor concentração do padrão deve ser injetada primeiro e deverá ser igual ou ligeiramente abaixo da menor concentração esperada da amostra. O maior padrão deve ser igual ou maior do que o esperado para amostra de maior concentração. Os outros padrões devem estar entre as concentrações de menor valor e as de maior valor, devendo ser usado no mínimo 3 padrões (3 concentrações) para elaboração da curva de calibração.

Padrões internos

Se as amostras forem diluídas e extraídas antes da análise, um conjunto de amostras “controle padrão” deverá passar pelo mesmo processo de extração para determinar os efeitos (as perdas) de preparação da amostra. Alternativamente, a cada amostra deve ser inserida uma quantidade conhecida de padrão e o cálculo da concentração final deve ser normalizado com base na concentração “interna” desse padrão. O uso de padrão interno corrige erros relacionados a volumes de injeção e é altamente recomendado por análises em cromatografia gasosa.

Revisão do software Varian CP3800

O cromatógrafo gasoso acoplado com o detector FID e ECD é controlado pelo software 5.51 da **Workstation**, usado para desenvolver e controlar métodos em corrida única ou para múltiplas injeções, ver resultados e modificá-los. As principais aplicações são acessadas via **Star toolbar**, mostradas na tabela abaixo. Esse **toolbar** também tem botões para métodos mais recentemente usados e resultados recentemente vistos.

Todas as análises de amostras e métodos são controladas pelo **System Control Application** e essa janela deve permanecer aberta durante o funcionamento do método e durante **standby**. O **System Control Toolbar** está localizado abaixo do **Star toolbar**. A tabela abaixo mostra o **System Control Toolbar** e descreve a função de cada tecla.

Tabela 2. Descrição do *Star Toolbar*.













Aplicação dos ícones <i>Star Toolbar</i>	Objetivo
System Control – Controle do Sistema	 <p>Monitorar o status do instrumento e controlar as análises de amostras. Essa janela se mantém aberta quando se está analisando ou em standby</p>
Method Editor – Editor de Método	 <p>Ver os parâmetros do método, aquisição e manipulação de dados</p>
Automated File Edition – Edição de Sequências	 <p>Editar listas de amostras e sequências para injeção enquanto o instrumento usa outro método</p>
Interactive Graphics – Manipulação de Cromatogramas	 <p>Ver o cromatograma da amostra, fazer a integração de picos e recalcular resultados</p>
GC Report Viewer – Relatório	 <p>Ver resultados e modificar relatórios, incluindo informações do método e da corrida</p>
GC Batch Reporting – Processamento de Relatórios	 <p>Criar relatório para um grupo de resultados</p>
Quick Start – Início Rápido	 <p>Ativar o método e correr uma única amostra sem a necessidade de uma Sample List</p>

Tabela 3. *System Control Tool Button.*

<i>System Control Tool Button</i>	Objetivo
<p align="center">Ilustração do <i>Toolbar</i></p> 	
	Criar um novo arquivo, selecionar previamente um arquivo recém-criado ou editar notas para um arquivo
	Ver, editar ou reativar um método
	Ativar um método
	Editar a informação de um módulo on-line (autosampler ou outro componente acoplado ao GC)
	Injetar uma única amostra
	Iniciar o recálculo da lista, da lista de amostras, da lista de sequências (a lista deve estar aberta)
	Pausas na automação. A amostra que está correndo será completada e, após a automação, a lista de sequência será suspensa. Quando o ícone Begin for pressionado, a sequência será reiniciada do ponto no qual foi suspensa
	Inicia a sequência de amostras
	Imediatamente para a corrida e a sequência. Se o ícone Begin for ativado a corrida começa do início da lista de sequência das amostras

Perigos em potencial

O cromatógrafo gasoso é conectado a diversos cilindros que devem ser mantidos em locais controlados e seguros. Quando os cilindros se encontram vazios (200 psi), devem ser devidamente fechados e lacrados.

O gás hélio que flui na coluna cromatográfica é purificado e seco por um tubo conversor que contém zircônio. Esse tubo pode explodir se aquecido em presença de ar. Nunca desconecte o tubo conversor do forno se estiver em funcionamento.

O forno do cromatógrafo, o injetor e o detector operam em altas temperaturas, por isso não se deve abrir a porta do forno ou tentar acessar o detector ou o injetor enquanto o instrumento estiver em operação.

Equipamentos de proteção individual (EPIs)

Equipamentos de proteção individual como jalecos, luvas de nitrila ou látex, sapatos e óculos de proteção são obrigatórios para toda e qualquer atividade laboratorial (Figura 2).



Figura 2. EPIs.

Procedimentos em caso de acidentes

Em caso de algum procedimento não usual no equipamento (cheiros, barulhos, etc.) contatar suporte técnico. Todos os incidentes devem ser comunicados ao técnico de instrumentação e ao responsável pelo equipamento e laboratório para que sejam tomadas ações e medidas de segurança.

O usuário do cromatógrafo gasoso com detector ECD (captura de elétrons) deve possuir um certificado da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e o laboratório deve ser autorizado por essa comissão para o uso de detectores com fontes radioativas. Qualquer incidente com esse tipo de detector deve ser comunicado ao responsável pelo laboratório, ao técnico de instrumentação e à CNEN. O monitoramento com detector Geiger (detector para radiação β), nesse caso, deve ser feito mensalmente.

Protocolo de uso

Procedimentos para ativação do cromatógrafo

1) Abertura dos **gases de arraste** (localizados na parte externa do laboratório).

- Ar sintético, hidrogênio, nitrogênio e hélio.
- Girar para o sentido anti-horário a válvula de abertura marcada em vermelho na Figura 3.

Figura 3. Gases de arraste.



2) **Ligar o compressor** na tomada 220 V e ativar colocando para baixo a chave vermelha em destaque na Figura 4.

Figura 4. Compressor de ar comprimido.



3) Acionar as **chaves internas** dos gases de arraste do laboratório (Figura 5) colocando na mesma direção da linha do gás.

4) **Ligar o computador** conectado ao cromatógrafo e acionar a chave da esquerda para direita para ligar o módulo do cromatógrafo GC-CP3800 Varian (Figura 6). Obs.: Por segurança esperar 3 minutos para ligar o módulo¹.

¹Existem filamentos dentro do cromatógrafo GC que são danificados se o equipamento for aquecido sem os gases de arraste.

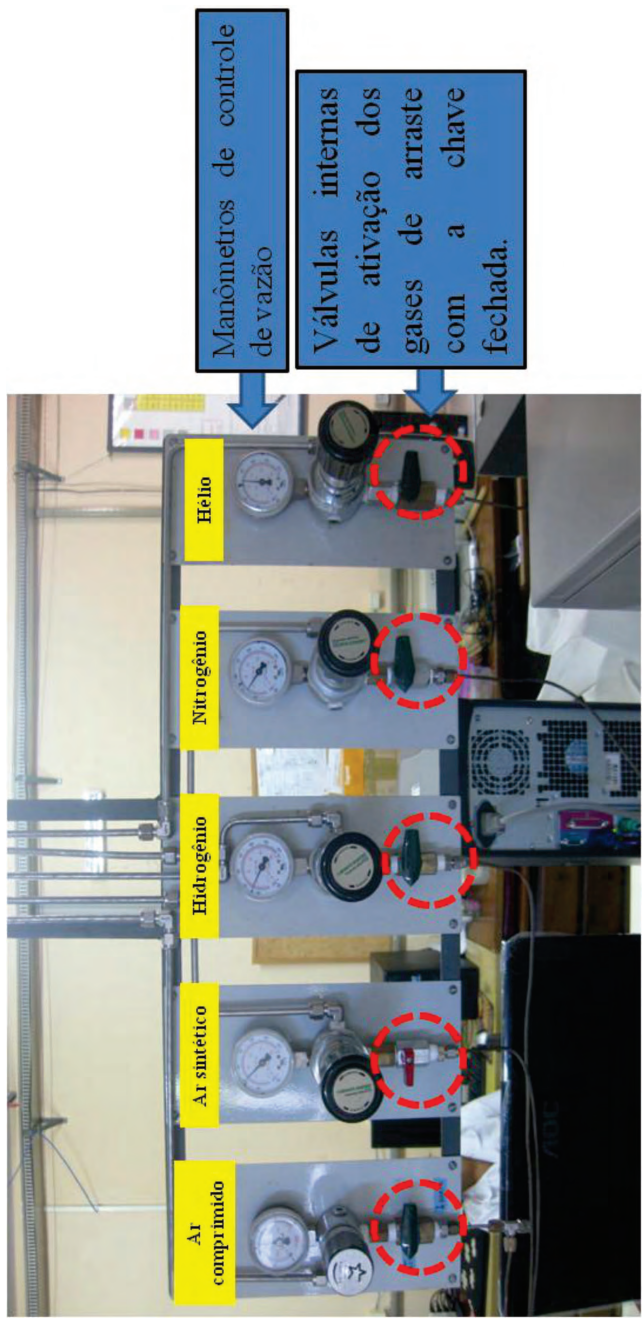


Figura 5. Sistema de linhas de gases de arraste localizado na parte interna do Laboratório de Análises de Sistemas Sustentáveis da Embrapa Amazônia Oriental.

Figura 6. Chave de acionamento localizada na parte superior do módulo do cromatógrafo GC-CP3800 Varian.



- Observar na tela do módulo a mensagem *initializing* e esperar a mensagem *Waiting for network connection* (Figura 7). Após essas mensagens, a tela de controle do sistema (*system control*) pode ser acionada no computador (Figura 8).

5) Acionamento do sistema de controle (conexão computador e módulo

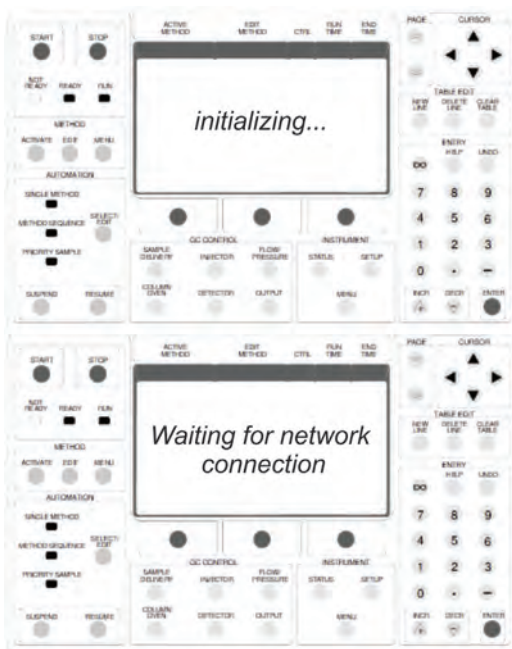


Figura 7. Painel de controle do módulo do cromatógrafo GC-CP3800 Varian.

do cromatógrafo GC). Após todos os procedimentos de conexão do computador com o módulo do aparelho, seguir os seguintes procedimentos:

- **Criar ou copiar o método** que vai ser utilizado para análise (Obs.: como existem métodos já configurados no computador, deve-se fazer cópia de um método preexistente para manter as informações de configuração).
- Clicar com botão direito do mouse no botão Iniciar do **Windows** e abrir o **Windows Explorer** → abrir a pasta **Star** → selecionar o método desejado (se possível um método de uma curva padrão com elevado R^2), copiar (CTRL + C) e colar (CTRL + V) na própria pasta (pasta em que se encontra todos os métodos executados). Renomear o método com as informações de local de coleta e data [extensão (*.MTH)] (Figura 8).



Figura 8. Efetuação da cópia do método de analítico do cromatógrafo GC.

- **Abrir** na tela do computador a janela (view) de controle do sistema (**System Control – CP**) de automação **Star Chromatography Workstation** para iniciar a conexão do computador com o módulo do cromatógrafo GC (Figura 9).

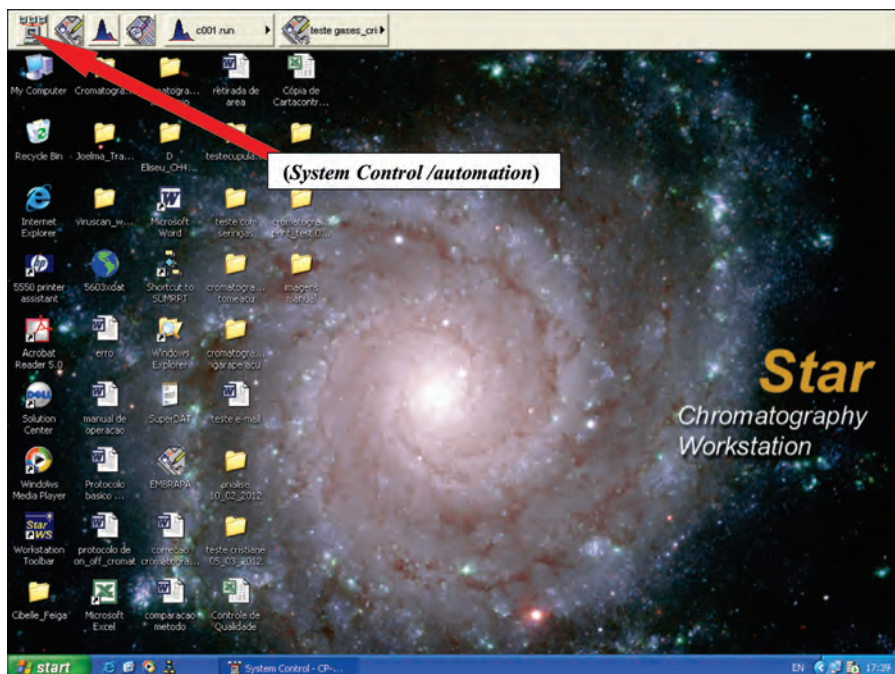


Figura 9. Tela de automação do software *Star Chromatography Workstation* no computador.

- Esperar a **estabilização das temperaturas** do sistema do cromatógrafo GC antes de ativar um método. Verificar ao lado esquerdo da tela do *System Control* a cor do ícone ao lado das indicações **Equilibrating** e **No fault**. Adota-se: **verde** para sistema equilibrado e **vermelho** para não equilibrado. As temperaturas do forno da coluna, válvulas e detectores precisam atingir os padrões de temperaturas configurados no sistema² (Figura 10).
- Iniciar os procedimento de limpeza da coluna necessários para eliminação de possíveis impurezas³. Executar o método de limpeza da coluna por 2 horas nas seguintes temperaturas: Front-FID = 200 °C; Mid-FID = 250 °C; Rear-ECD = 300 °C.

²A temperatura é um dos fatores determinantes para a separação eficiente dos compostos analisados. Cada detector possui no manual do aparelho uma temperatura considerada eficiente para uma boa eluição das amostras.

³Com o aquecimento do sistema em altas temperaturas (suportado pela coluna), resíduos existentes ao longo da coluna eluem e são eliminados em amostras de limpeza do aparelho (ar atmosférico = branco).

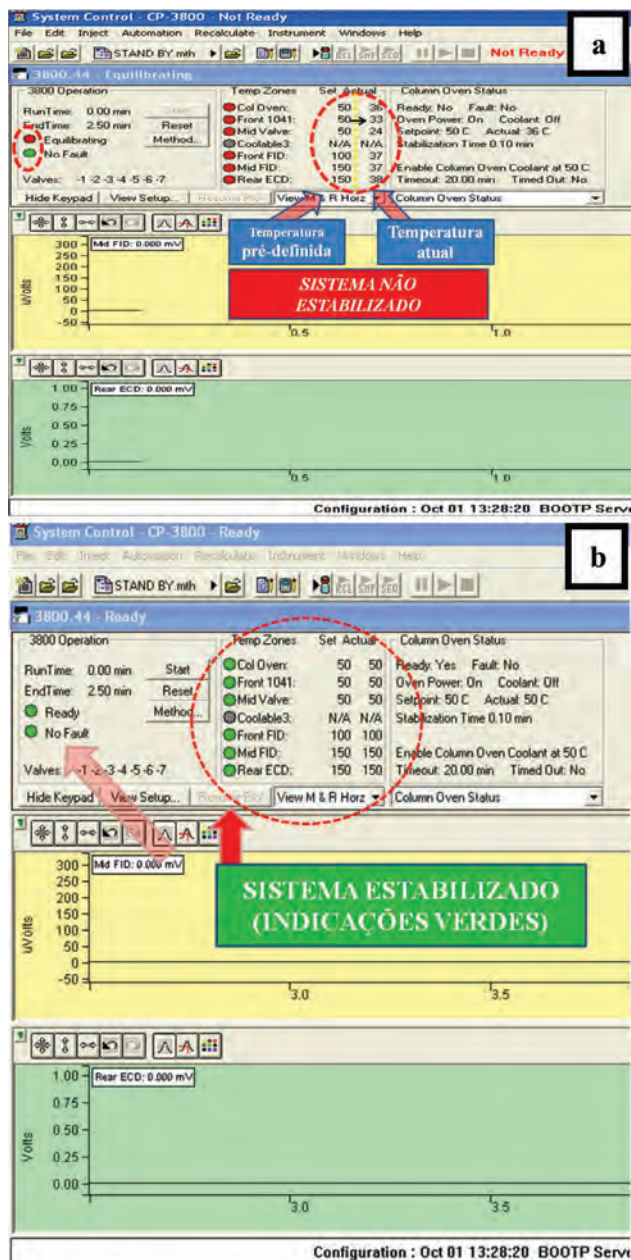


Figura 10. a) Sistema de controle (System Control – CP) de automação Star Chromatography Workstation com as temperaturas do forno da coluna, detectores e válvulas não equilibradas para análise; b) Sistema totalmente equilibrado com destaque para os ícones de verificação das temperaturas.

Procedimento de limpeza da coluna

1) Após a estabilização das temperaturas, abrir o método Limpeza da Coluna; **System Control** → **File** → **Activate Method** → **Activate a System Control Method File** → Selecionar o método de Limpeza da Coluna existente na pasta e clicar em **Abrir** (Figura 11).

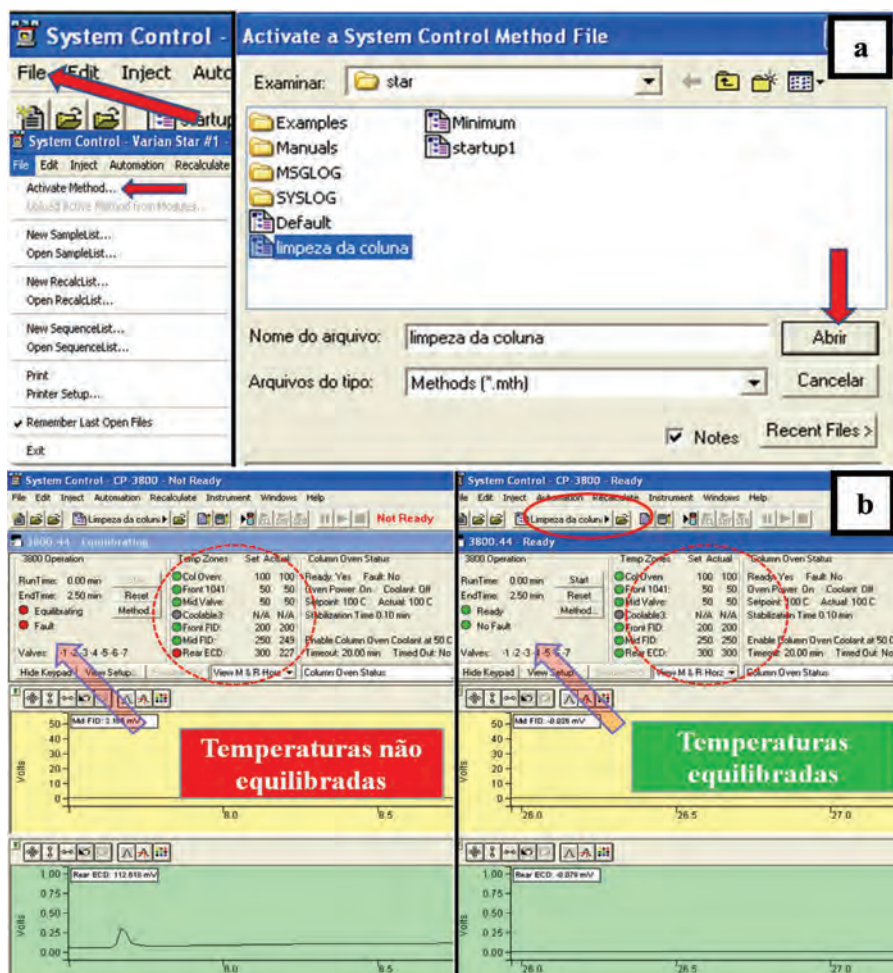


Figura 11. a) Comandos para acionamento do método de limpeza da coluna; b) Sistema do *Star Chromatography Workstation* com método de limpeza acionado. Detalhe para as temperaturas e para a confirmação do acionamento do método no lado direito superior da imagem.

- **Criar planilha e pasta de amostras a serem analisadas:** *System Control File* → *Activate Method* → *New Samplelist* → *Create A New System Control Samplelist File* → *Star* → Abrir a pasta *Data* → Inserir o nome da planilha com dados do local e data [extensão (*.SMP)] e *Salvar* (Figura 12). Aparecerá na tela a *Generic Samplelist*⁴ e criar pasta → *Data Files* → *Data Files Generation* → *New Folder* (Inserir o mesmo nome criado para a planilha *.SMP) → *Create A New Folder in the Selected Directory* → OK → verificar o nome da planilha para confirmar o procedimento e OK (Figura 13).
- Digitar na **Sample List** os padrões em triplicata. Antes de passar o primeiro padrão, deve-se executar três brancos (procedimento de limpeza da coluna por segurança). Executar dois brancos entre cada padrão analisado e, antes de iniciar as amostras de campo, executar três brancos⁵ (Figura 14).

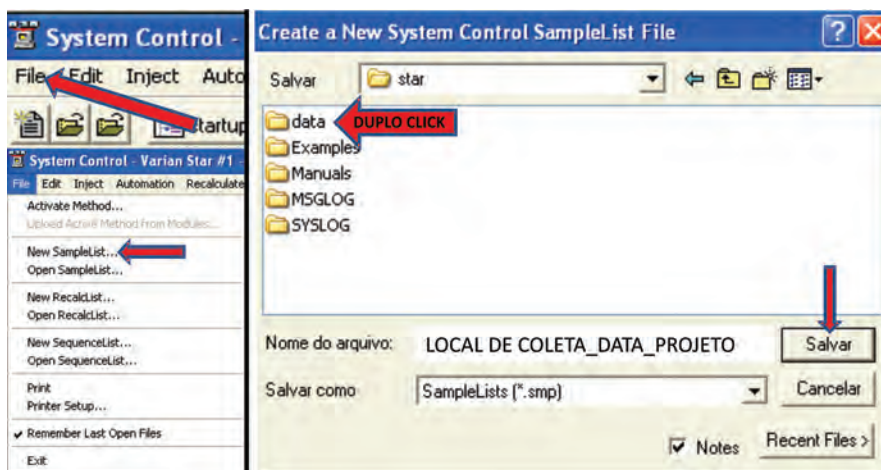


Figura 12. Comandos para criação da planilha de amostras a serem analisadas.

Obs.: É importante fazer monitoramento dos brancos (ar atmosférico analisado no aparelho para servir de amostra de eliminação de resíduo), principalmente com a injeção de amostras muito concentradas, exigindo-se uma quantidade maior de brancos. Para amostras de baixa e média concentração, após alguns testes em laboratório, verificou-se a necessidade de dois brancos entre cada amostra para o CH₄ e um branco para o N₂O.

⁴A planilha *.SMP criada precisa ser colocada em uma pasta, pois o programa não cria pastas automáticas para armazenamento de dados, o que faz com as informações salvas fiquem espalhadas na pasta central Star.

⁵Considerando a concentração elevada do último padrão após alguns testes, verificou-se a necessidade de eliminação de resíduo da coluna.

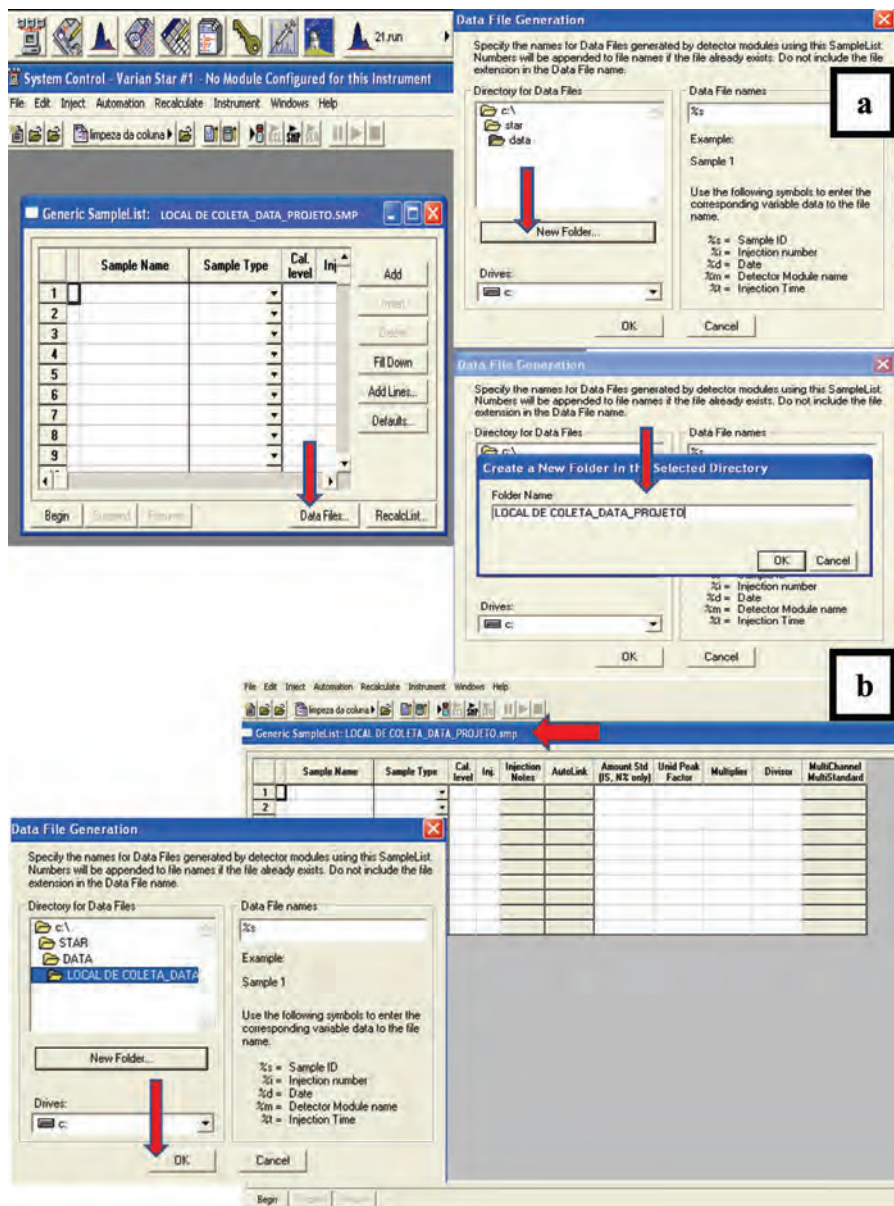


Figura 13. a) *Generic SampleList* à esquerda e comandos de criação da pasta para armazenamento das amostras analisadas; b) Finalização da criação da pasta analítica.

Etapa analítica

1) Ativação do método de análise.

- Após as 2 horas de limpeza da coluna, **ativar o método copiado** segundo os procedimentos de ativação de método apresentado no tópico Limpeza da Coluna (Utilizar os mesmos comandos, trocando apenas o método de análise. Em lugar de *limpeza da coluna.mth*, ativar o método desejado) e esperar estabilizarem as temperaturas do sistema.

2) Ativação da planilha de amostras.

- **Samplelist** (Figura 14): Begin → OK; verifica local da pasta e nome → OK; no *System Control* aparecerá a mensagem **Not Ready** e depois **Waiting**. Injetar o primeiro branco quando aparecer a mensagem **Waiting** (Figura 15).

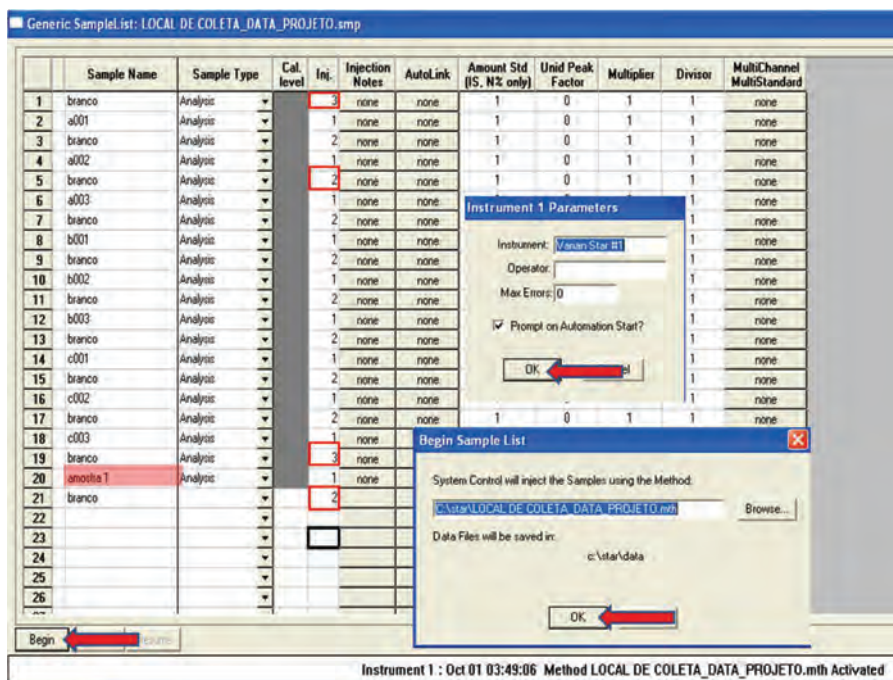


Figura 14. Comandos para ativação da *Samplelist*. Destaque para o número de brancos a serem executados de acordo com tipo de amostra (padrão e/ou amostra de campo)⁶.

⁶Padrões de calibração de gases analíticos – N₂O: A = 0,341; B = 0,810; C = 1,32 e CH₄: A = 1,96; B = 0,984; C = 3,07, valores em ppm.



Figura 15. Tela do *System Control* com detalhe para as mensagens *not ready* e *waiting* à direita na parte superior da tela do computador.

Obs: Entre uma injeção e outra somente introduzir amostras quando aparecer a mensagem ***waiting***.

3) Injeção manual (***on-column***) de amostras no cromatógrafo GC-CP3800 Varian.

- Injetar no aparelho todos os padrões analíticos com a intercalação dos brancos necessários para calibração das curvas padrão de análise antes da injeção das amostras de campo⁷ (Figura 16).

Obs.: Os cilindros das misturas de padrão analítico de referência devem ser armazenados em local de temperatura homogênea e sem interferência de umidade. Todo o sistema da mistura padrão deve ser bem isolado em termos de septos e válvulas, pois não pode ocorrer entradas de ar nos cilindros por causa de contaminação. Por isso, é necessário realizar vistoria e manutenção nos septos em que se faz a introdução da seringa com agulha (***ultra fine***) para retirada do gás padrão. Os padrões analíticos devem ter alta pureza [Valores de referência para pureza de padrões (ISO 6141:2000): Baixa = 99,995 (4.5); Média = 99,999 (5.0); Alta = 99,999 (6.0)].

⁷Após a introdução no aparelho de todos os padrões analíticos de alta pureza, pausar as injeções e calibrar a curva padrão de análise. A curva padrão precisa ser calibrada todas as vezes que se iniciar uma nova análise, pois de acordo com cada momento analítico poderá ocorrer variações no sistema (ex. corrente elétrica) o que vai interferir na acuraria dos dados analisados. É importante deixar sempre uma amostra a mais na *Samplelist* sem analisar, pois esta quando totalmente analisada fecha automaticamente.



Figura 16. Cilindros de gases padrão de calibração do cromatógrafo GC e procedimento de manuseio.

- Introduzir a amostra no injetor manual (**on-column**) com auxílio de uma seringa de polipropileno de 10 ml⁸ que possui uma torneira de três vias. Para a injeção, deve-se abrir a torneira da seringa e, posteriormente, abrir a torneira do injetor e apertar no botão Start do painel de controle do módulo do cromatógrafo GC-CP3800 Varian (Figura 17).

Obs.: Para eliminar umidade residual da amostra usa-se **drierite** no injetor, que deve ser trocado periodicamente no início de uma nova análise. Para isso, retira-se com uma chave inglesa a porca e a conexão visualizada no ponto 1 e com o auxílio de um funil coloca-se o dessecante no ponto 2 (Figura 17). O drierite é um dessecante de alta qualidade⁹ feito a partir de 97% de sulfato de cálcio (CaSO_4) e 3% cloreto de cobalto (CoCl_2) anidro, quimicamente inerte, exceto para a água, e pode ser regenerado. A substituição deve ser feita quando a cor padrão (azul) ficar rosa por causa da absorção de traços de água (H_2O). Recomenda-se regeneração a 235 °C ou 450 F em mufla por 2 horas.

⁸As amostras devem ser transferidas para as seringa 3 minutos antes das injeções para evitar trocas com o meio ambiente.

⁹W.A. Hammond Drierite CO. LTD.

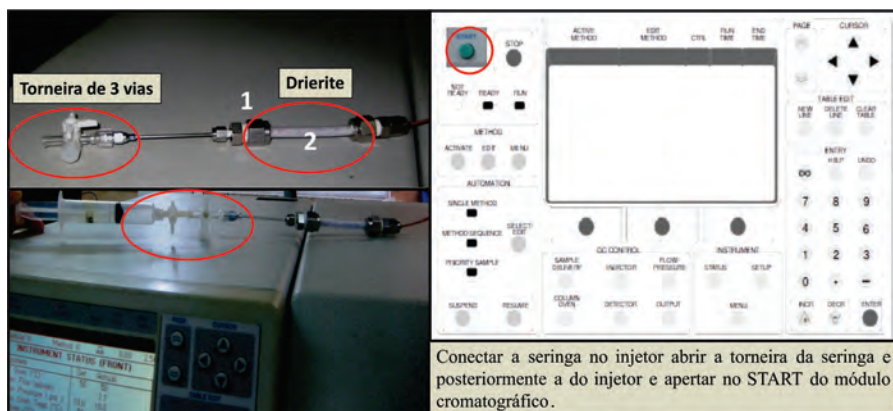


Figura 17. Injeção de amostras no cromatógrafo GC-CP3800 Varian.

Calibração analítica

1) Executar a edição dos cromatogramas por meio dos procedimentos de integração cromatográfica para cálculo de área em volts min^{-1} ou mvolts sec^{-1} . Para isso, deve-se abrir o método copiado para a execução da análise de resultados e calibração da curva padrão segundo as configurações preexistentes no método.

- Clicar em **View/Edit Chromatograms** → abrir *Interactive Graphic*; aparecerá a view → *Open Mutiplus Data File* → Fechar → Clicar em *File* e ir em *Open Method* → *Star*; selecionar o método copiado [extensão. *.mth] → *Open* para ativar → *Select Method Data Handling Section* e escolher o canal de identificação – detector (*Front*; *Middle*; *Rear*) → OK; confirmar método ativado na parte superior da tela de automação¹⁰ (Figura 18).

2) Integração dos cromatogramas dos padrões analíticos.

- Com o método ativado, clicar em *Open Chromatogram(s)* → *Open Multiple Data Files* → *Star* → *Data*; procurar a pasta de análise, abrir e selecionar 7 padrões do menos concentrado para o mais concentrado com duplo clique → clicar em *Channel* e escolher o identificador de análise de resultados (*Front*=FID; *Middle*=FID; *Rear*=ECD) → *Open File(s)* → *Reintegrate Now*¹¹ (Figura 19).

¹⁰O método precisa sempre estar ativado, pois o software precisa da curva padrão como referência para o cálculo de integração. No caso de calibração da curva padrão o software vai utilizar a curva que foi salva no método copiado.

¹¹A linha de integração cromatográfica deve ser posicionada tangenciando a linha de base, para isso, deve-se arrastar a barra amarela e a linha localizada na parte inferior da tela do computador. Deve-se integrar cada pico antes de efetuar a calibração, para isso o **software** permite a integração de 7 picos por **view** de edição.

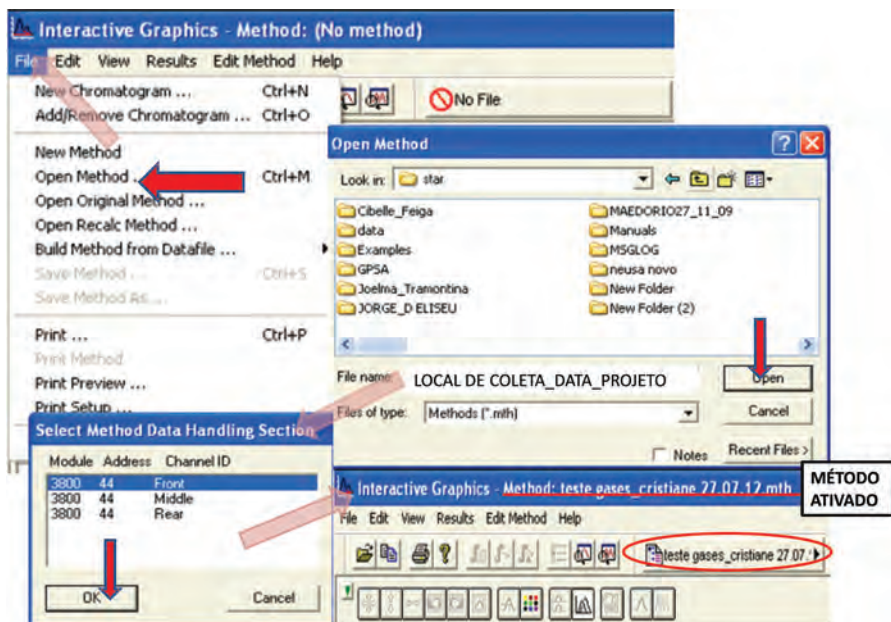


Figura 18. Comandos para ativação do método de edição dos cromatogramas. Com destaque inicialmente sem método e posteriormente com o método ativado no procedimento de análise de dados.

3) Calibração da curva padrão com 9 pontos.

- **Reintegration List Dialog** (📄) → clicar em *Sample Type* e selecionar *Calibration* para todos os padrões → na coluna *Cal. Level*, ordenar os padrões em sequência crescente (1; 2; 3) → em *calibration coefficients*, selecionar *Clear Coefficients at Start of List*¹² → *Calculate Results* → aparecerá a pergunta: *All calibration coefficients will be cleared - continue reintegration?* Selecionar Sim (Figura 20).
- Clicar em *Results* → *View Calibration Curve* → no tópico *origin* clicar em *Ignore*¹³ → *Save* → *Edit Calibration Curve Dialog*; aparecerá a pergunta: *Write changed record to the file?* Selecionar Sim e clicar em Fechar (❌). Sem fechar a **view Interactive Graphics**, voltar para os comandos iniciais do segundo tópico para incorporar os pontos restantes (Figura 21), seguindo os procedimentos descritos a seguir.

¹²Deve-se excluir a curva padrão salva no método copiado para poder configurar a nova curva de análise que ficará salva e servirá de parâmetro tanto para às injeções efetuadas no momento da análise quanto para às integrações de dados.

¹³Anotar o coeficiente de determinação R^2 e a curva linear da análise estatística (*External Standard Analysis*) descrita na *view calibration curve*.

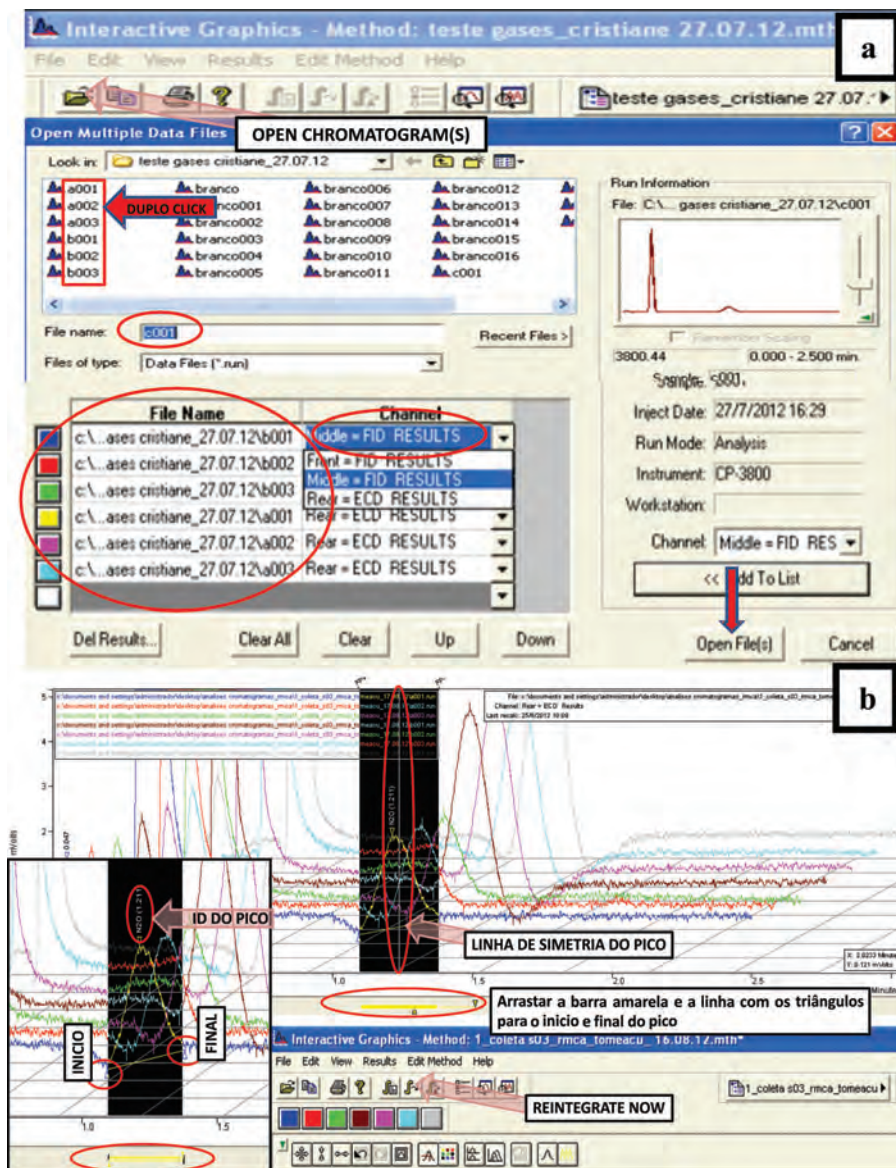


Figura 19. a) Comandos de edição dos cromatogramas para integração cromatográfica dos pontos da curva padrão; b) Detalhe para os procedimentos e parâmetros de integração: Barra de simetria e linha de integração, ponto inicial e final do pico, linha de simetria para parâmetro de saturação de coluna e ícone de integração (*reintegration now*).

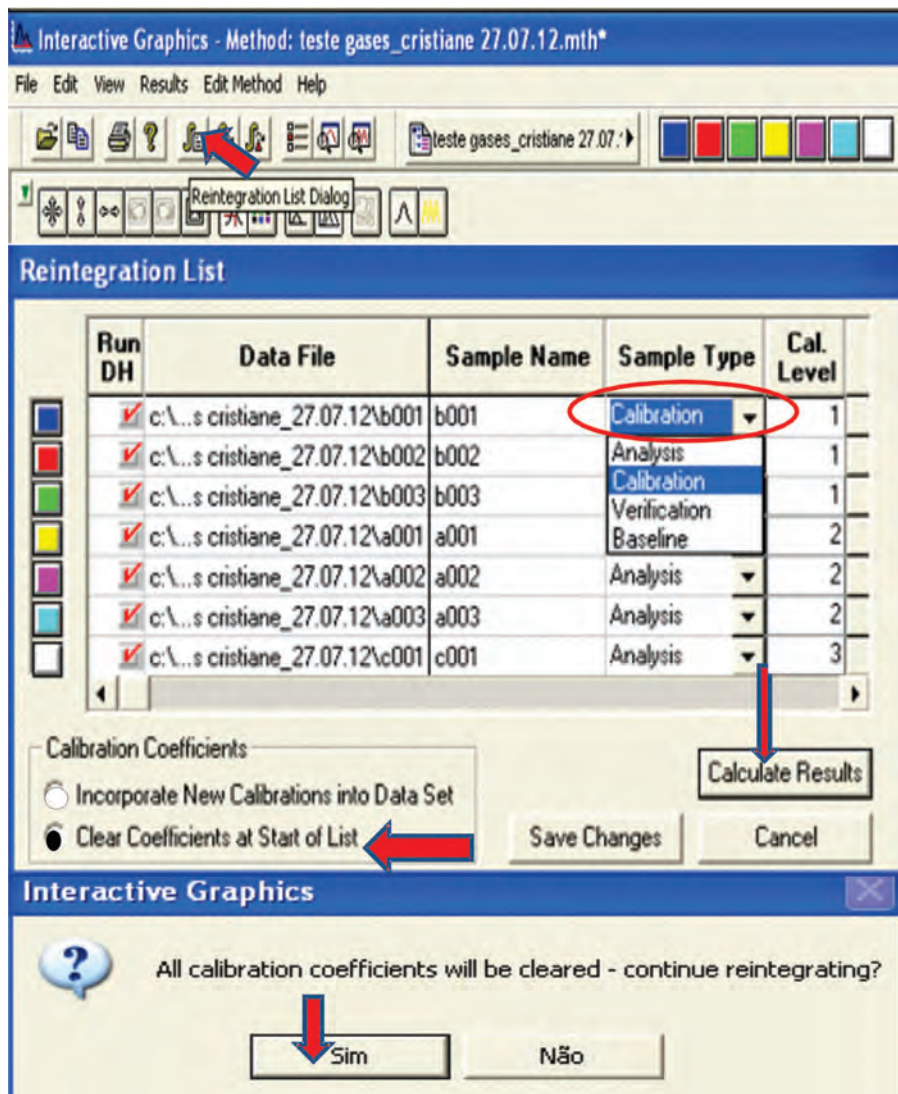


Figura 20. Procedimentos para calibração da curva padrão analítica.

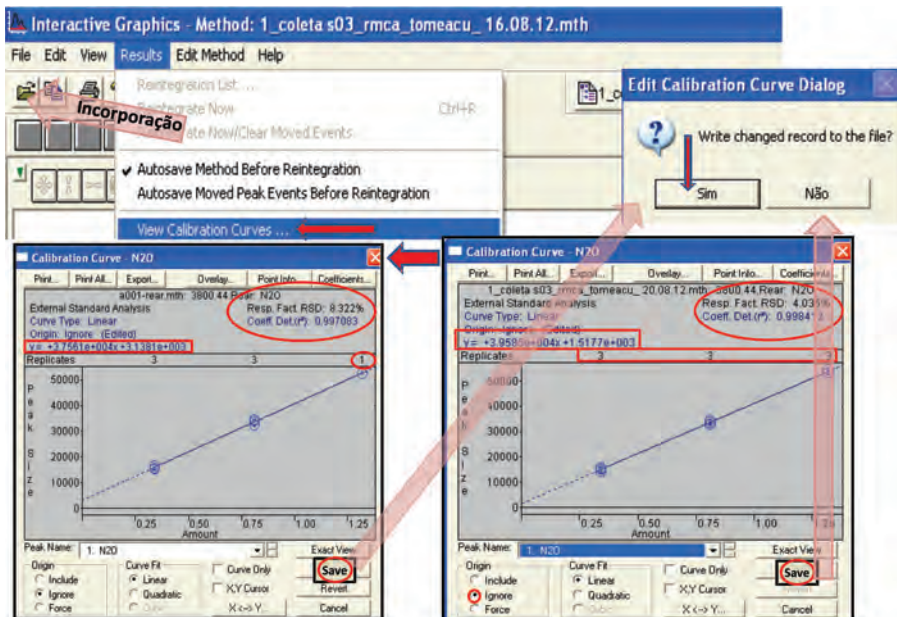


Figura 21. View de calibração final de curva padrão com sete pontos e com nove pontos. Destaque para a curva linear e o valor de R², referência de acurácia dos pontos inseridos na curva.

- **Incorporar** os dois pontos restantes para completar a curva de calibração. Para acrescentar os dois pontos restantes, devem-se repetir os procedimentos do segundo tópico **Calibração da curva padrão** (Integração dos cromatogramas dos padrões analíticos). Na **view Open Mutiples Data Files**, clicar em **Clear All**, selecionar os padrões restantes e continuar conforme os procedimentos do segundo tópico. Em seguida, efetuar a repetição do terceiro tópico da **Calibração da curva padrão** → **view Reintegration List Dialog**; clicar em **calibration coefficients**, selecionar **Incorporate New Calibrations Into Data Set** e continuar conforme os procedimentos do terceiro tópico (Figura 22).
- Após a calibração, anotar as áreas dos pontos da curva. Na **view Calibration Curve**, executar duplo clique em cima de cada ponto inserido na curva de calibração, aparecerão dados de área em mvols sec^{-1} e concentração em ppm. Para finalizar e salvar a curva padrão, clicar em Fechar (X) **Interactive Graphics** → na janela **Save Modified Method** clicar em **Save**¹⁴ (Figura 23).

¹⁴Efetuar os mesmos procedimentos repetindo o processo desde o início para todos os canais a serem analisados (*Front* = FID; *Middle* = FID; *Rear* = ECD). A opção de troca do canal é na **view Select Method Data Handling Section** apresentada no primeiro tópico da **Calibração da curva padrão**.

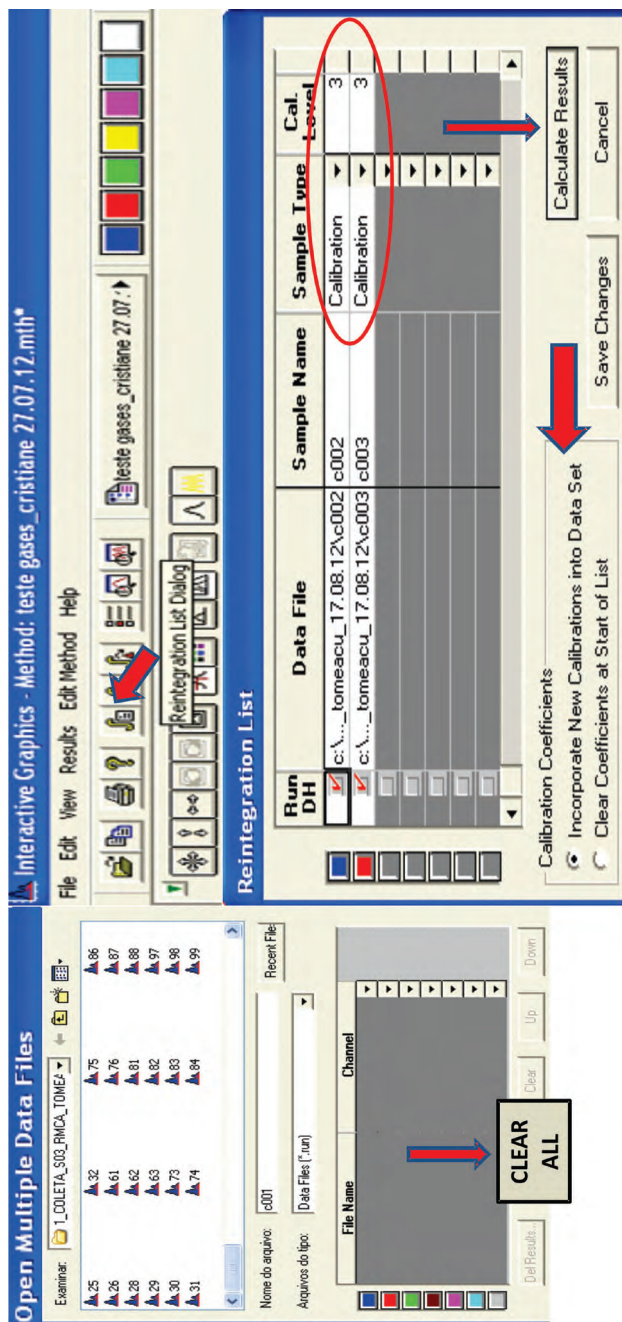


Figura 22. Comandos diferenciados para incorporação de pontos na curva de calibração.

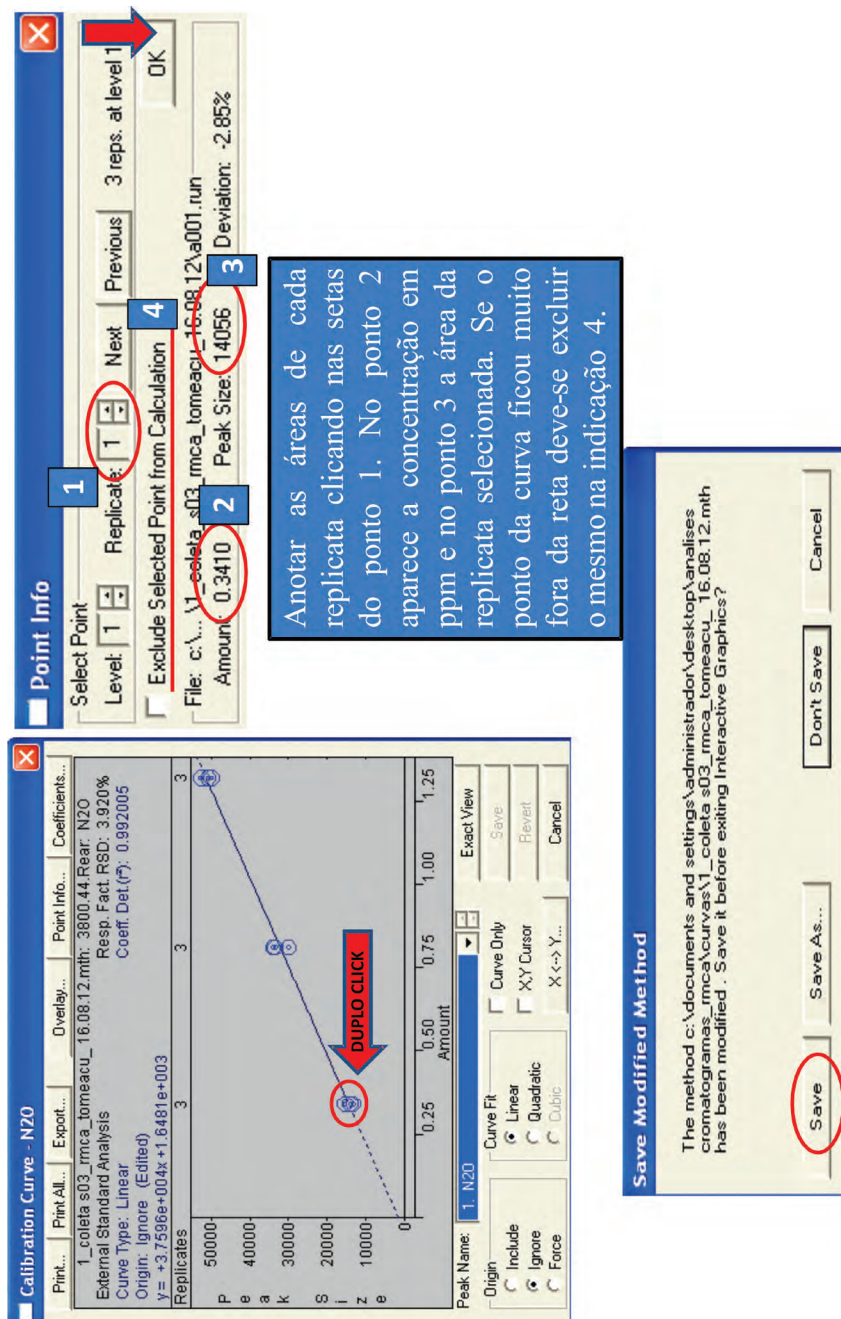


Figura 23. Procedimentos finais de calibração da curva padrão.

4) Confirmação da curva padrão.

- Após a execução das curvas padrão para os canais de análise, deve-se confirmar se as curvas criadas foram salvas com sucesso.
- Para iniciar a análise das amostras de campo, clicar em **View/Edit Chromatograms** → abrir **Interactive Graphic**; aparecerá a **view Open Mutiplus Data File** → Fechar → Clicar em **File** e ir em **Open Method** → **Star**; selecionar o método copiado [extensão. *.mth] → **Open** para ativar → **Select Method Data Handling Section** e escolher o canal de identificação – detector (**Front; Middle; Rear**) → OK → **Results**; clicar em **View Calibration Curve**, verificar curva criada e fechar (❌) sem salvar → clicar em Fechar (❌) **Interactive Graphics**. Repetir os mesmos procedimentos para todos os canais em análise.

Início da injeção das amostras de campo

- Após a calibração e confirmação das curvas padrão, retornar à planilha de amostras que já deve estar com as amostras digitadas (a planilha precisa ser sempre alimentada com uma amostra a mais para não fechar automaticamente) e continuar o processo de análise com as amostras de campo.
- Retirar as amostras do refrigerador ($\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), colocar na sequência da **Samplelist** e organizar próximo do aparelho em ordem de injeção. Dessa forma, deve-se retirar todas as amostras a serem efetuadas na bateria de análise do dia. As amostras devem ficar em ambiente com ar refrigerado, em temperatura estável, sem interferência de umidade.
- Para prolongar a integridade dos septos dos frascos de coleta, utilizar agulha de transferência do tipo **ultra fine**, que deve ser empregada somente para a passagem da amostra dos frascos de coleta para a seringa. O furo no septo deve ser centralizado (Figura 24).
- Cuidado com entupimento de agulhas. Devem-se fazer trocas e vistorias periódicas no material de análise: agulhas e septos dos frascos de campo.
- Confirmar o método e verificar a mensagem **Waiting** no **System Control** → abrir a **Samplelist** e observar um (x) ao lado da amostra a ser injetada. A amostra só deve ser introduzida no sistema se ao lado do nome estiver aparecendo o ícone de amostra atual (x). Quando forem selecionadas duas ou mais repetições de injeção (ocorre nos brancos) na mesma amostra, aparecerá ao lado do nome a quantidade crescente em números até chegar na última repetição, na qual aparecerá o (x) (Figura 25).



Figura 24. Organização das amostras de campo.

System Control - CP-3800 - Waiting for Instrument Modules

File Edit Inject Automation Recalculate Instrument Windows Help

LOCAL DE COLETA_DATA_PROJETO.mth **Waiting**

Generic Sample list: LOCAL DE COLETA_DATA_PROJETO.smp

	Sample Name	Sample Type	Cal. level	Inj.	Injection Notes	AutoLink	Amount Std (IS, N2 only)	Unit Peak Factor	Multiplier	Divisor	MultiChannel MultiStandard
1	branco	Analysis	3	none	none		1	0	1	1	none
2	a001	Analysis	1	none	none		1	0	1	1	none
3	branco	Analysis	2	none	none						
4	a002	Analysis	1	none	none						
5	branco	Analysis	2	none	none						
6	a003	Analysis	1	none	none						
7	branco	Analysis	2	none	none						
8	b001	Analysis	1	none	none						
9	branco	Analysis	2	none	none						
10	b002	Analysis	1	none	none						
11	branco	Analysis	2	none	none						
12	b003	Analysis	1	none	none						
13	branco	Analysis	2	none	none						
14	c001	Analysis	1	none	none						
15	branco	Analysis	2	none	none						
16	c002	Analysis	1	none	none						
17	branco	Analysis	2	none	none						
18	c003	Analysis	1	none	none						
19	branco	Analysis	2	none	none						
20	amostra 1	Analysis	1	none	none						
21	branco	Analysis	2	none	none						
22											
23											
24											
25											
26											

Três repetições de injeção de amostra

	Sample Name	Sample Type	Cal. level	Inj.
1	branco	Analysis		3
2	branco	Analysis		3
1	branco	Analysis		3
2	a001	Analysis		1

Número de repetições de injeção

Amostra atual sem repetições

Begin Stop Cancel

Instrument 1 : Oct 01 03:49:05 Method LOCAL DE COLETA_DATA_PROJETO.mth Activated

Figura 25. Planilha de análise cromatográfica ativada para injeção de amostras. Destaque para os procedimentos a serem verificados antes da injeção.

Procedimentos para desligar o cromatógrafo GC ou ativar *Standy by*

1) Ativação do método desligar.

- Fechar a **Samplelist** (❌). No **System Control**, ir em **File** → **Activate Method** → **Activate a System Control Method File**. Selecionar o método Desligar existente na pasta **Star** e clicar em **Abrir**; esperar equilibrar as temperatura para esfriamento do sistema (Figura 26).

2) Fechamento do sistema: software de automação, gases de arraste e modulo cromatográfico.

- Fechar (❌) o software de automação **Star Chromatography Workstation**. Aparecerá a mensagem **Shutting Down** (Figura 27).

Na parte interna do laboratório, fechar as chaves dos gases interno e desligar o módulo cromatográfico. Na parte externa, desligar o compressor e fechar as válvulas de gases de arraste.

3) Ativação do método *Standy by*.

- Em baterias analíticas extensas, adota-se o método **standy by**. Tal procedimento permite a utilização e manutenção da curva padrão calibração sem alteração das condições de análise e sistema.
- Fechar a **Samplelist** (❌). No **System Control**, ir em **File** → **Activate Method** → **Activate a System Control Method File**. Selecionar o método **Standy By Novo** existente na pasta **Star** e clicar em **Abrir**; esperar estabilizar as temperaturas para esfriamento do sistema (Figura 28).
- Esperar esfriarem as temperaturas¹⁵, **desligar** as chaves internas do **Ar sintético, Ar comprimido e Hidrogênio** e manter todo o sistema ligado (módulo cromatográfico e computador). Na parte externa do laboratório, desligar o compressor e fechar os gases de arraste **Ar sintético e Hidrogênio**.

¹⁵No método **Stand by**, como o cromatógrafo GC não vai ficar em análise durante um tempo, os detectores são configurados com as temperaturas desligadas para não ficar aquecido sem necessidade. Mantendo-se assim a precaução de não danificar o aparelho por algum problema com os gases de arraste.

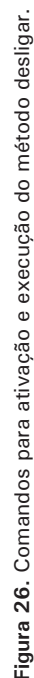


Figura 26. Comandos para ativação e execução do método desligar.

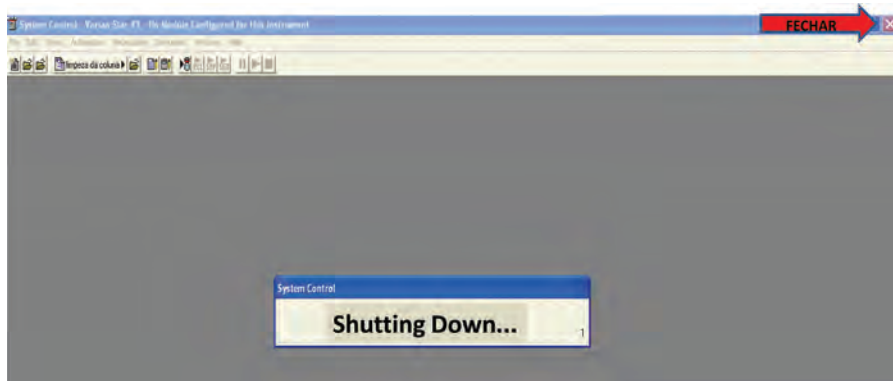


Figura 27. Finalização do software de automação *Star Chromatography Workstation*.

Procedimentos de segurança e possíveis problemas (*troubleshooting*)

1) Gases de arraste.

- Os cilindros de gás devem ser mantidos na parte externa do laboratório, em local sem umidade e luz. Certifique-se de que os cilindros estejam contidos firmes na posição vertical. Se ocorrer um acidente, o cilindro for derrubado e danificar a válvula, acontecerá uma explosão. Deve-se monitorar os reguladores de pressão para saber a quantidade de gás dentro do cilindro.
- Pressão padrão (entrada no aparelho cromatográfico) verificada nos manômetros das chaves internas dos gases de arraste: Ar comprimido = 500 Kpa; Ar sintético = 400 Kpa; Hidrogênio = 300 Kpa; Nitrogênio = 500 Kpa; Hélio = 600 Kpa.
- Não deixar o cromatógrafo aquecer sem a passagem dos gases de arraste por causa de degradação de componentes internos do aparelho. Na Figura 29, pode ser visualizada uma indicação de não passagem de gás de arraste no sistema. Os sinais de automação **not ready** (aparelho não ativado para injeção da amostra), **ready** (aparelho ativado para injeção da amostra) e **run** (amostra em análise) ficam acionados ao mesmo tempo e todo o sistema trava. Ocorrendo isso, deve-se acionar o método **Stand by** e verificar, primeiramente, os gases de arraste e, posteriormente, o método configurado.

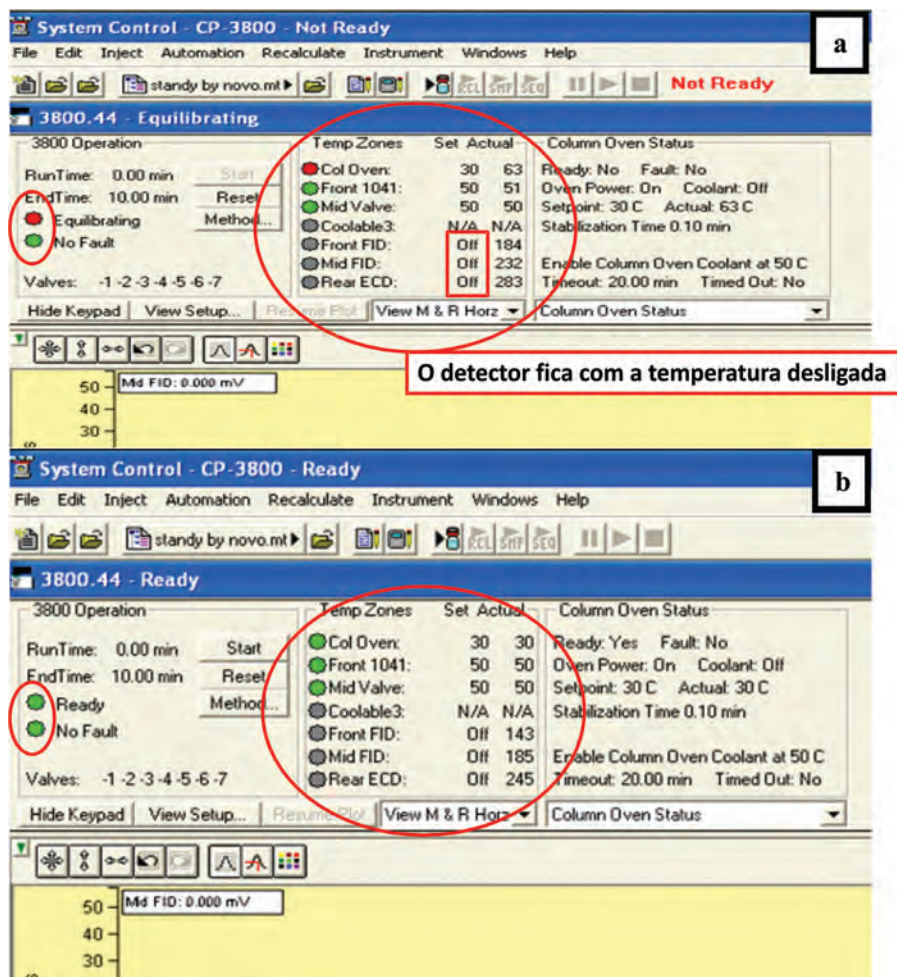


Figura 28. a) Método *Stand by* ativado com as temperaturas fora do equilíbrio; b) Temperaturas em equilíbrio do método *Stand by*. Detalhe para a indicação off dos detectores.

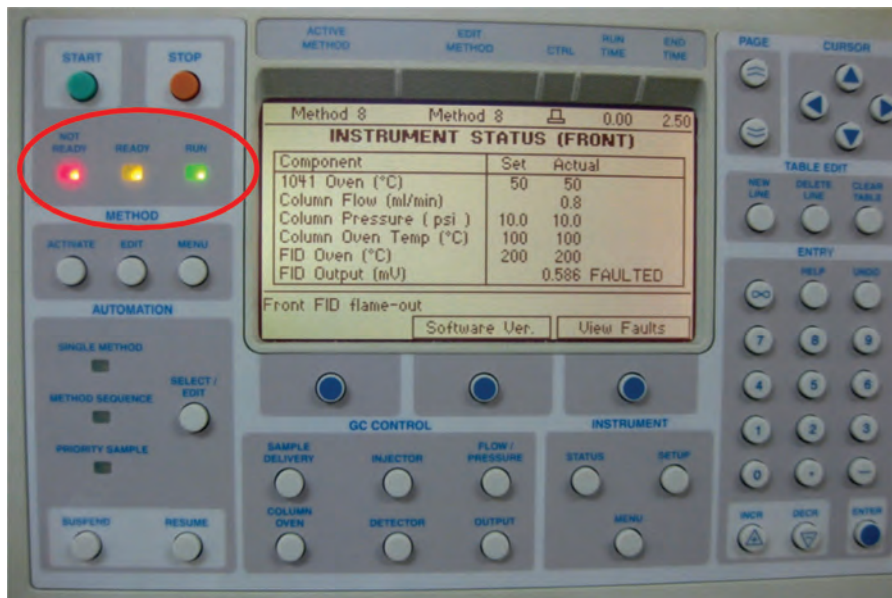


Figura 29. Sinais de automação *not ready*, *ready* e *run* acionados ao mesmo tempo indicando algum problema no sistema.

2) Controle da temperatura.

- Não alterar as temperaturas da configuração padrão de análise por causa de risco de degradação da coluna, volatilização da FE líquida, aumento da viscosidade dos gases de arraste e consequentemente menor vazão, não eluição da amostra. A temperatura deve ser mantida com exatidão e precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.
- A temperatura do forno da coluna tem que ser uniforme em seu interior e não pode ser afetada pela temperatura do injetor e detector.

3) Controle de umidade do ambiente e das amostras.

- Verificar as datas de troca de pré-filtro e substituir em todas as análises o drierite do injetor. Os cilindros de padrão analítico devem passar por monitoramento e manutenção em válvulas e septos para evitar entrada de O_2 e traços de H_2O em engates e conexões. Verificar pressão do manômetro para controle de quantidade de gás interno.

4) Fontes de problemas.

- As principais fontes de ruídos são: erros do operador, contaminação nas amostras por falta de limpeza nos frascos de coleta, entrada de ar ou traços de H₂O por ineficiência de septos, aterramento elétrico e sistema deficiente¹⁶, provocando alteração da linha de base, contaminação nos gases de arraste, impurezas acumuladas no detector e no sistema de fluxo de gases.

5) Áreas e itens a serem checados.

- Gases – pressões, velocidade linear, fluxo (no detector e injetor).
- Temperaturas – coluna, injetor, detector, linhas de transferência.
- Linhas dos gases e filtros – limpeza, vazamentos, expiração dos filtros.
- Consumíveis do injetor – septos, liners, anilhas, drierite.
- Integridade da amostra – estocagem, limpeza do material de coleta, septo do frasco de coleta, procedimentos de coleta.
- Seringas – técnica de manuseio, vazamentos, limpeza, agulhas.
- Sistema de dados – ajustes e conexões.

Resultados analíticos

Edição e análise de cromatogramas – *view / edit chromatograms*

Após a finalização da etapa analítica no cromatógrafo GC-CP3800 Varian, é necessário fazer a manipulação e edição dos cromatogramas gerados para quantificação da concentração do analito (ppm) em identificação.

Na edição e análise de cromatogramas é possível:

- Alterar o modo de integração cromatográfica.
- Obtenção do resultado de área (volts min⁻¹ ou mvolts sec⁻¹) do pico e concentração do analito (ppm).
- Alterar parâmetros do método de integração (inibição de solvente, eventos de tempo, função zoom, etc.).
- Obter a relação sinal/ruído.

¹⁶É indicada a existência de um circuito elétrico separado para o aparelho cromatográfico para não haver problemas de oscilação de corrente elétrica, amperagem e tensão do sistema.

- Número de pratos teóricos.
- Comparar cromatogramas.
- Verificar simetria do pico: *gaussian, tailing, leading*.

1) Abrir os cromatogramas para análise de resultados.

Para a execução da análise de resultados, segundo as configurações preexistentes no método analítico salvo, deve-se fazer a alteração de integração cromatográfica, função presente na **Star Toolbar** (Figura 30), com o método ativado.



Figura 30. Barra de ferramentas da Workstation Varian - Versão 5.0.

- A partir da **Star Toolbar** (página de apresentação da Workstation), com o botão direito do mouse, selecionar **Run Application** (Figura 31) e **View/Edit Chromatograms** ou clicar no ícone ().

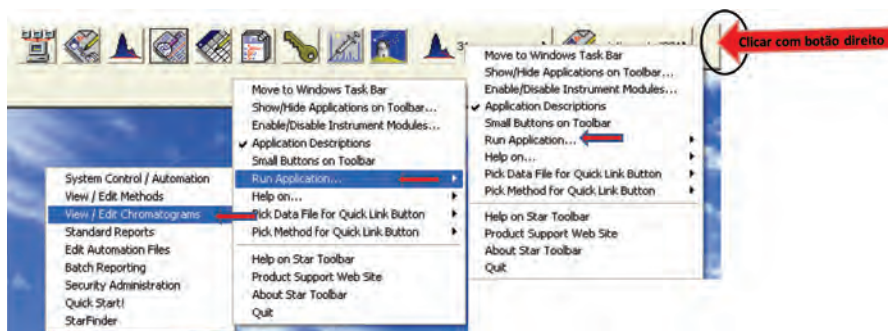


Figura 31. Comandos de entrada na view de edição de cromatogramas.

- **View/Edit Chromatograms** → abrir **Interactive Graphic**. Aparecerá a **view Open Mutiplus Data File** → **Star** → **Data**; abrir a pasta de amostras analisadas, selecionar os cromatogramas (sete no máximo) com um duplo clique no nome da amostra ou clique no nome do arquivo → **Add To List Open File(s)** → clicar em **Channel** e escolher o identificador de análise de resultados (**Front = FID; Middle = FID; Rear = ECD**) → **Open File(s)** (Figura 32). Em seguida, abrir o método.

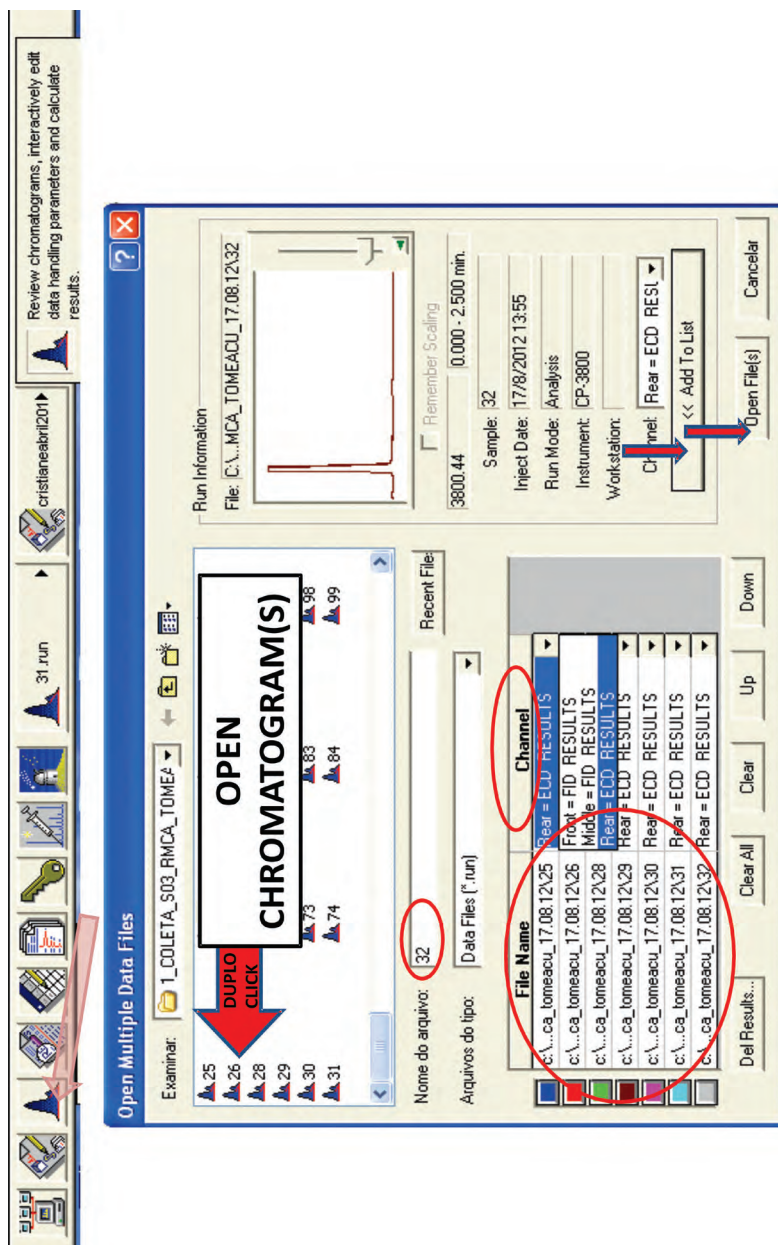


Figura 32. Procedimentos para seleção e abertura de cromatogramas para análise de resultados.

Obs.: Ocorrendo algum problema na seleção do cromatograma em análise, deve-se clicar em **File Names** → **Clear** ou **Clear All** (Figura 33).

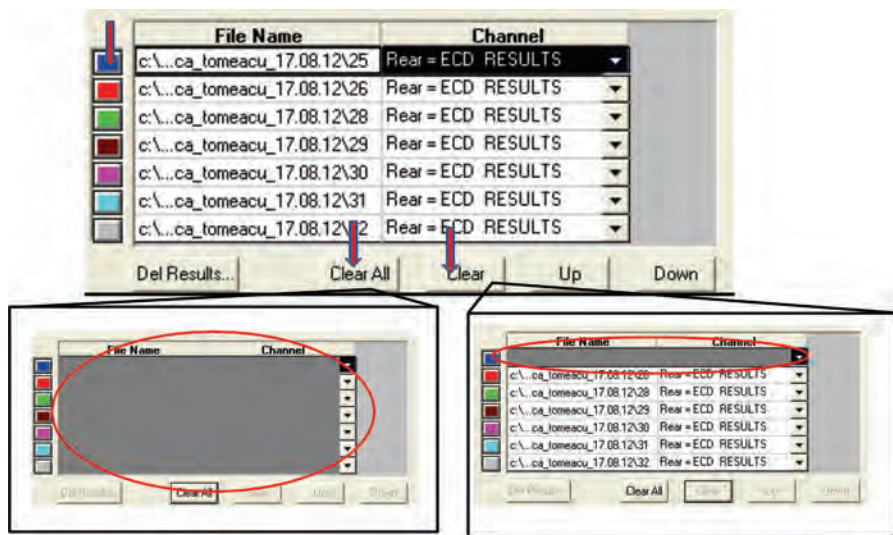


Figura 33. Comandos para desfazer a seleção de cromatogramas.

2) Abrir o método de análise de resultados.

- Clicar em **File** e ir em **Open Method** → **Star**; selecionar o método criado [extensão. *.mth] → **Open** para ativar → **Select Method Data Handling Section** e escolher o canal de identificação - detector (**Front**; **Middle**; **Rear**) → OK; confirmar método ativado na parte superior da tela de automação (Figura 34).
- Clicar na barra de rolagem para mudar unidade de volts min⁻¹ para mvolts sec⁻¹ para poder executar a integração cromatográfica. Com a visualização do pico, colocar o mouse no centro do pico em análise e observar um quadro de informação no lado direito inferior da tela do computador (Figura 35).

3) Realizar integração cromatográfica

Para obter os resultados de área e concentração do analito analisado, deve-se alterar as integrações cromatográficas. A linha de integração dos cromatogramas precisa ser posicionada tangenciando a linha de base.

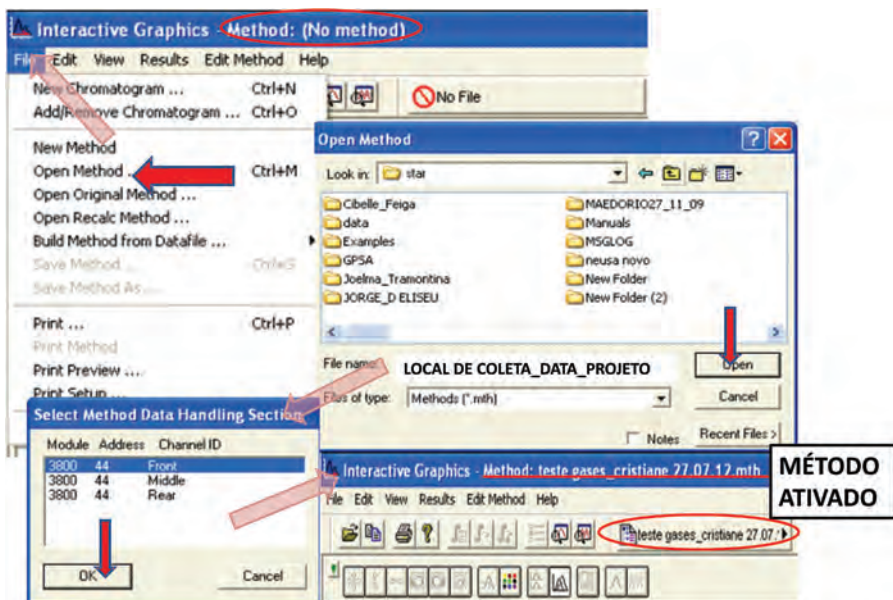


Figura 34. Procedimentos de ativação do método de análise.

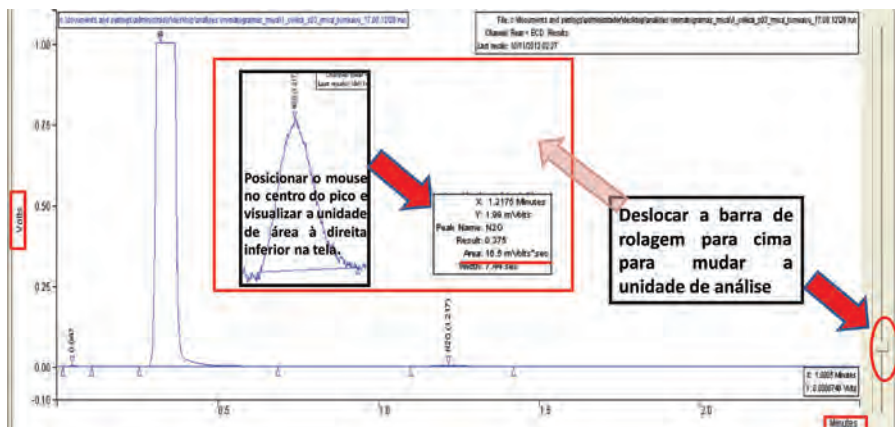



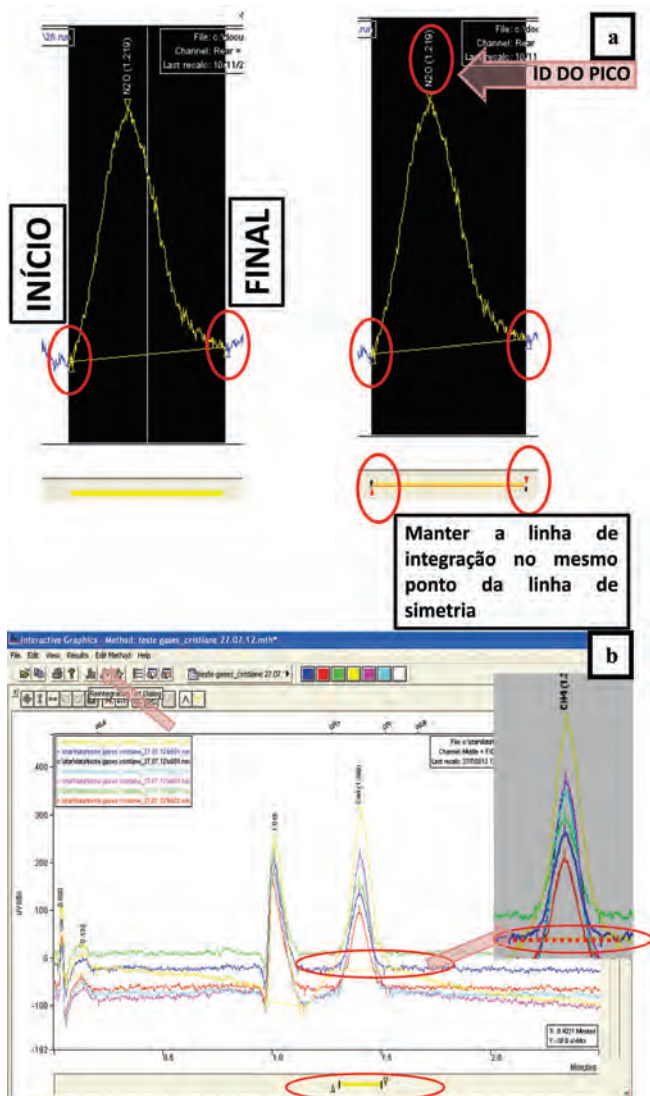


Figura 35. Procedimentos de mudança de grandeza para integração e análise de resultados.

- Após abrir os cromatogramas a serem integrados e o método para análise (o software precisa da curva padrão como referência para o cálculo de integração), clicar na barra de simetria do pico () e ajustar colocando centralizada partindo do ponto inicial do sinal do pico ao ponto final. Efetuar o mesmo procedimento com a linha de integração (); em seguida, clicar no ícone localizado na **Star Toolbar** → **Reintegrate Now** () (Figura 36).



Obtenção do resultado

- Clicar no centro do cromatograma com o botão direito do mouse → **View Results Only** → **Channel Front-Fid Results**; escolher o canal de identificação – detector (**Front; Middle; Rear**) em **Channel**. Anotar em uma planilha a área (mvolts sec^{-1}) do pico e a concentração do analito (ppm) observada no relatório de análise (Figura 37).

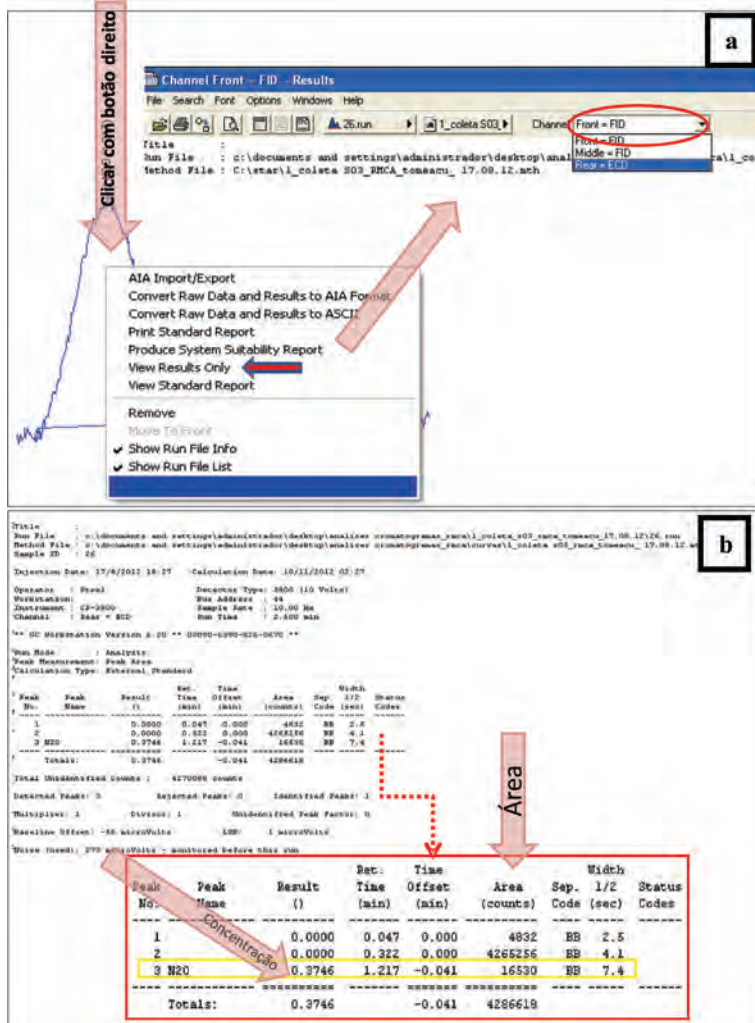


Figura 37. a) Comandos para abrir a view de resultados; b) Relatório de resultado analítico da amostra.

Elaboração de relatório de análise (*standard reports*)

O relatório de análise contém informações sobre o cromatograma analisado, podendo ser alterado em funções básicas de *layout*.

- Clicar com o botão direito do **mouse** no **Start Toolbar**; selecionar **Run Application** → **Standard Reports** ou clicar no ícone (🖨️) → **Open Data File** → **Star** → **Data**; abrir a pasta de amostras analisadas, selecionar os cromatogramas com um duplo clique no nome da amostra → **Open File**. Aparecerão duas **views**, uma referente ao cromatograma e outra ao relatório de análise (Figura 38).
- Para alterações no relatório de análise (título do relatório de análise, opções do cromatograma e opções do resultado), clicar em **Options** na barra de ferramentas, escolher as funções de opção de edição desejadas do **Standard Reports** para alterar e finalizar clicando em OK (Figura 38).

Descrição das funções de opção de edição do **Standard Reports**:

Report Title

- Possibilita alterar o título do cromatograma analisado.

Chromatogram Format

- **Start Time e End Time**: permite selecionar o intervalo de tempo de impressão do cromatograma.
- **Auto Scale**: Enquadra automaticamente o maior pico do cromatograma na escala do papel. A *Workstation* estabelece automaticamente o valor para a Atenuação (**Initial Attenuation**) e para o **Offset (Zero Offset)**. O valor de atenuação e **Offset** também pode ser estabelecido manualmente.
- **Length in Pages**: permite selecionar em quantas páginas o cromatograma será impresso. A *Workstation* estabelecerá um valor automático para a velocidade do papel ou pode-se estabelecer um valor fixo para a velocidade do papel por meio de **Initial Chart Speed**, desabilitando a função **Length in pages**.
- **Chromatogram Annotations**: possibilita selecionar o que será visualizado no cromatograma, como Tempo de Retenção, Eventos de Tempo, Eventos do Cromatograma, Nome dos Picos e Linha de Base.

Results Format

- **Amount Units**: permite dar nome à unidade de medida dos picos.
- **Number of Decimal Digits**: possibilita estabelecer o número de casas decimais.
- **Run Documentation**: admite selecionar o que será impresso no relatório, como Histórico da Corrida, Histórico de Erros, Relatório de Calibração, Histórico de Alterações e Notas sobre a amostra.

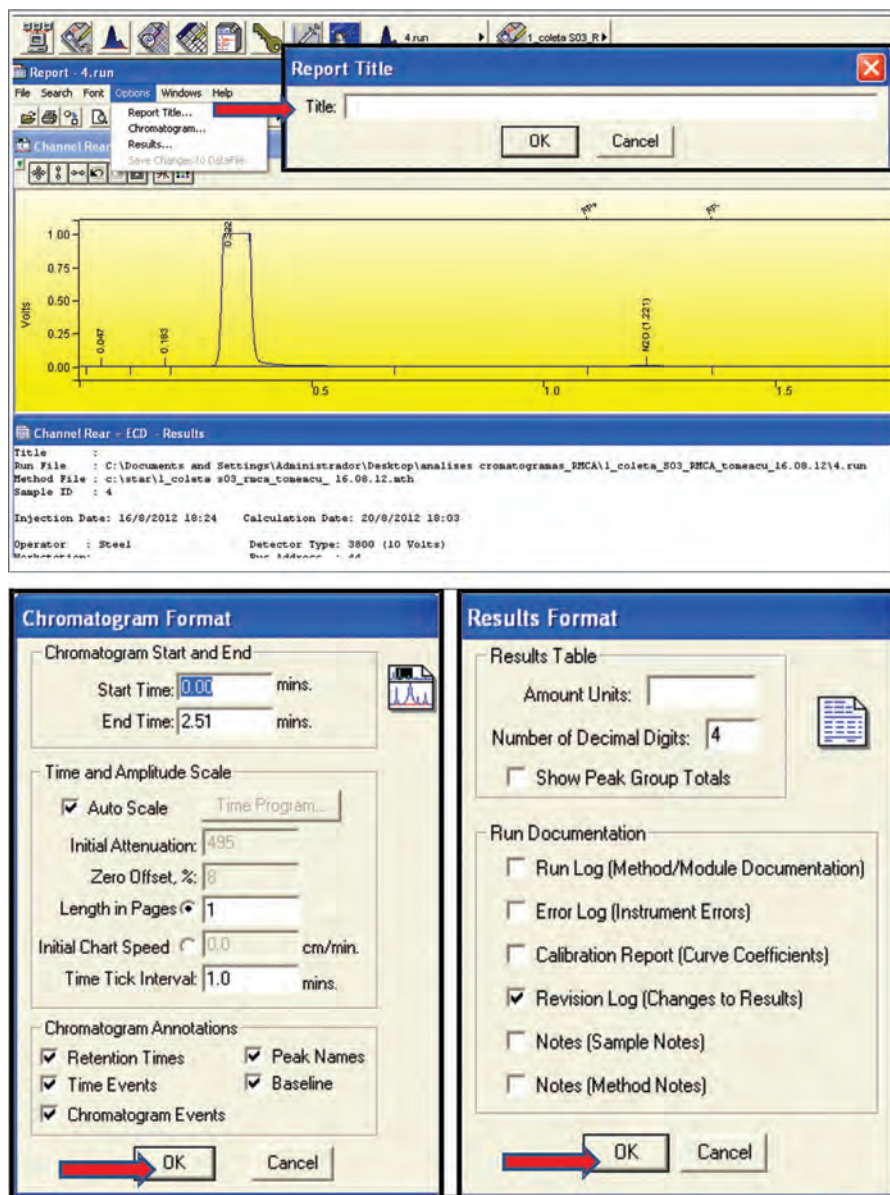


Figura 38. Standard Reports e a função de opções para edição de relatório.

- Para converter os resultados em **Ascii**, encaminhar os dados do relatório no Word ou em uma planilha Excel e imprimir, clicar em **File** na barra de ferramentas (Figura 39).

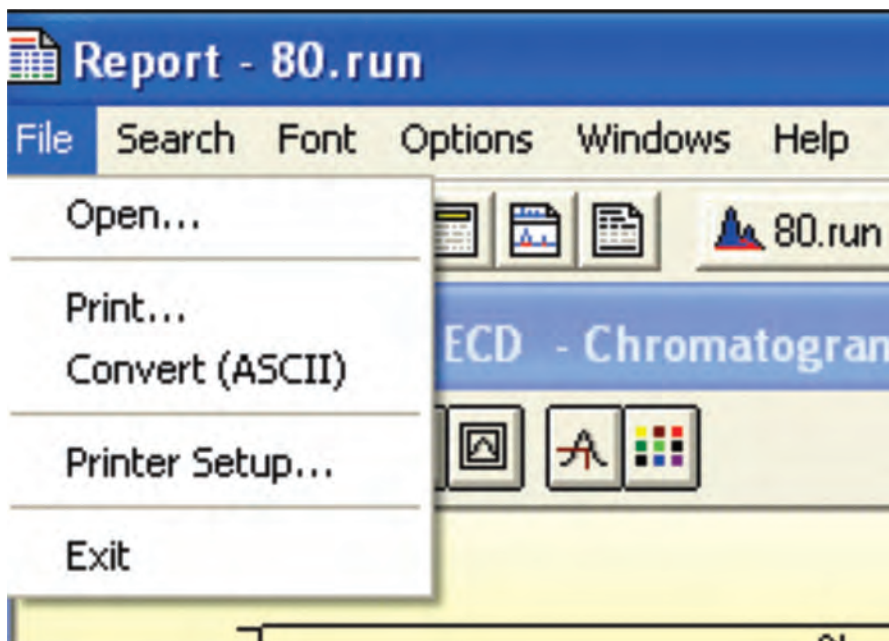


Figura 39. Comandos para conversão do arquivo gerado em outros formatos (word e excel) e impressão.

Outras funções que podem ser alteradas ou monitoradas

O programa de automação e análise cromatográfica *Workstation* Varian - Versão 5.0 possibilita monitorar configurações de acurácia de dados ou alterar qualquer parâmetro de análise e, posteriormente, reintegrar um ou mais cromatogramas.

1) Alteração de parâmetros de configuração.

Set password (Configurar senha)

Method notes (Quadro de anotações do método)

Integration parameters (Parâmetros de integração)

Peak table (Quadro de pico)

Time events (Eventos de tempo)

Calibration setup (Configuração de calibração)

Verification setup (Configuração de verificação)

Fill peak table (Alterar o quadro de pico)

- **Interactive Graphic** → clicar em **Edit Method** → acesso às janelas da seção **Data Handling** do Método analítico. Depois de alterar qualquer parâmetro de análise, clicar em **Results** e ir em **Reintegration List**, selecionar a opção **Clear Coefficients At Start Of List** → **Calculate Results Save Changes** (Figura 40) ou **Reintegrate Now** (🔄) (modificação de apenas um cromatograma).

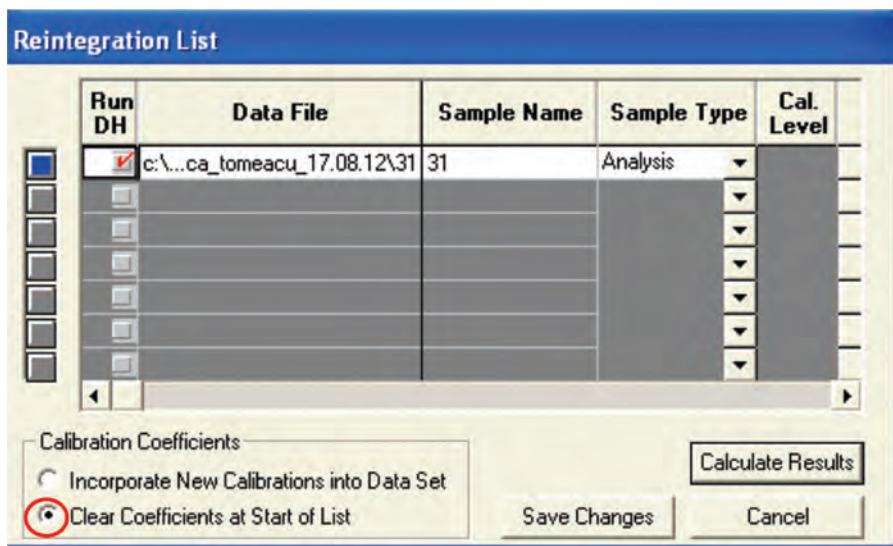


Figura 40. Procedimentos para efetivar as alterações feitas nos parâmetros de análise.

2) Adicionar eventos de tempo (alteração de parâmetro de integração).

Alterações de parâmetros de análise podem ser executadas para melhor obtenção dos resultados. Dessa forma, é possível incluir itens no método de integração utilizado.

- **Interactive Grafic** → clicar em **Edit Method** → **Add Method Item**; seleccionar o evento a ser adicionado (Figura 41). Depois de alterar qualquer parâmetro de análise, clicar em **Results**, ir em → **Reintegration List** → seleccionar a opção **Clear Coefficients at Start of List** → **Calculate Results** **Save Changes** ou **Reintegrate Now** (🔄) (modificação de apenas um cromatograma).

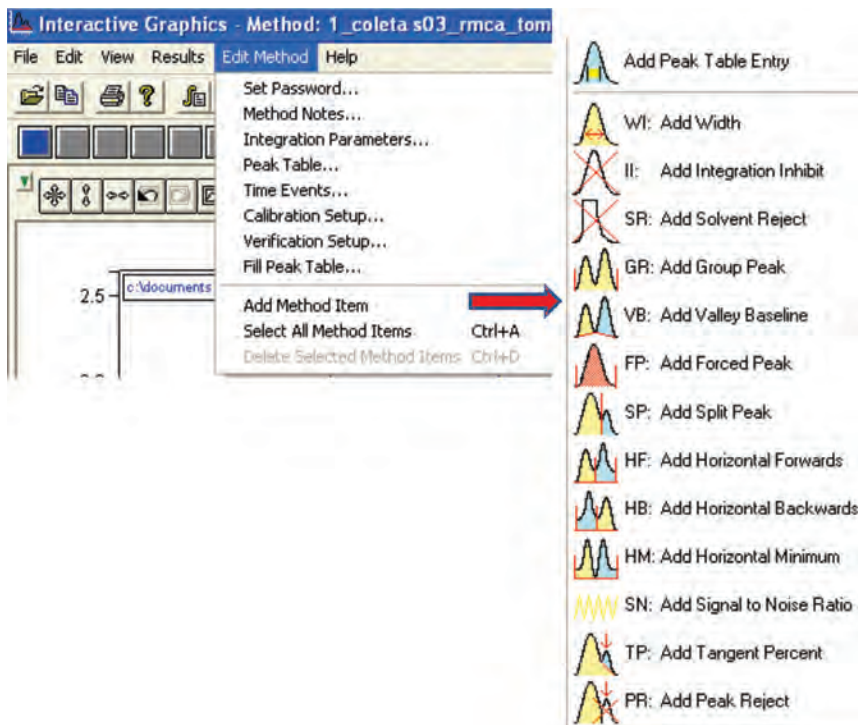
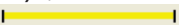
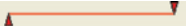


Figura 41. Comandos para adição de eventos de tempo no método em análise.

Descrição dos tipos de eventos:

- **Add Peak Table Entry** (Adicionar Entrada da Tabela de Pico – Barra de simetria amarela) .
- **Add Width** (Adicionar Barra de Largura de Pico).
- **Add Integration Inhibit** (Adicionar Linha de Integração de Inibição de Pico).
- **Add Sovent Reject** (Adicionar Linha de Rejeição de Solvente).
- **Add Group Peak** (Adicionar Linha de Integração de Pico Agrupado – Integração única).

- *Add Valley Baseline* (Adicionar Linha de Base de Vale – Cria uma janela de tempo no qual todos os pontos de vale são forçados a comportar-se como pontos de referência para a integração do pico).
- *Add Forced Peak* (Adicionar Linha de Integração de Pico – Linha Vermelha) .
- *Add Split Peak* (Adicionar Barra de Divisão de Pico).
- *Add Horizontal Forwards* (Adicionar Linha Horizontal de Integração para Picos Adiantados).
- *Add Horizontal Backwards* (Adicionar Linha Horizontal de Integração para Picos Atrasados).
- *Add Horizontal Minimum* (Adicionar Linha Horizontal de Integração para Picos Mínima Detecção).
- *Add Signal to Noise Ratio* (Adicionar Barra de Sinal-ruído).
- *Add Tangent Percent* (Adicionar Barra de percentagem de um pico referência em relação a um pico tangente).
- *Add Peak Reject* (Adicionar Barra de Pico Rejeitado – Elimina picos muito pequenos a partir do relatório para garantir que os picos insignificantes não sejam confundidos com picos de interesse).

3) Parâmetros de monitoramento.

Para monitoramento é possível: verificar a simetria do pico; fazer comparações de cromatogramas [Verificação de tempo de retenção, linha de base, ruído, etc.] (Figura 42); verificar detalhes de um cromatograma por meio da função zoom; conferir números de pratos teóricos.

- Para selecionar o zoom → manter pressionado o botão esquerdo do mouse e selecionar o cromatograma ou a parte onde vai ser feito o zoom (Figura 43). Para sair da função zoom, deve-se efetuar um duplo clique no cromatograma. Para sair do zoom, dar um duplo clique no mouse.

Obs.: Para mudar a cor dos cromatogramas clicar em *View* e ir em *Preferences*.

- A verificação de números de pratos teóricos é feita na função ***Produce system suitability report***. Clicar com o botão direito em cima do cromatograma → ***Produce System Suitability Report Open Method*** → Fechar (❌) → ***System Suitability*** (Figura 44).

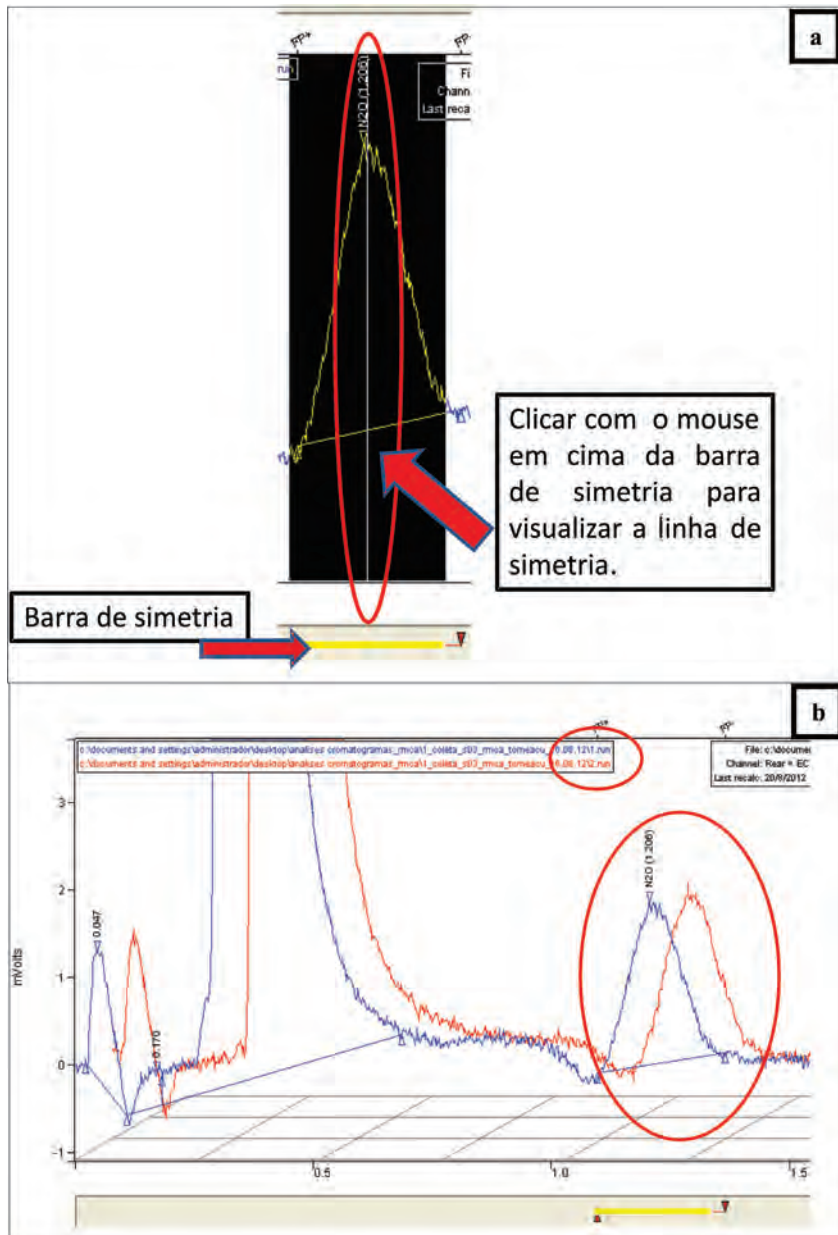


Figura 42. a) Procedimentos para verificação da simetria do pico; b) Comparação de cromatogramas diferentes.

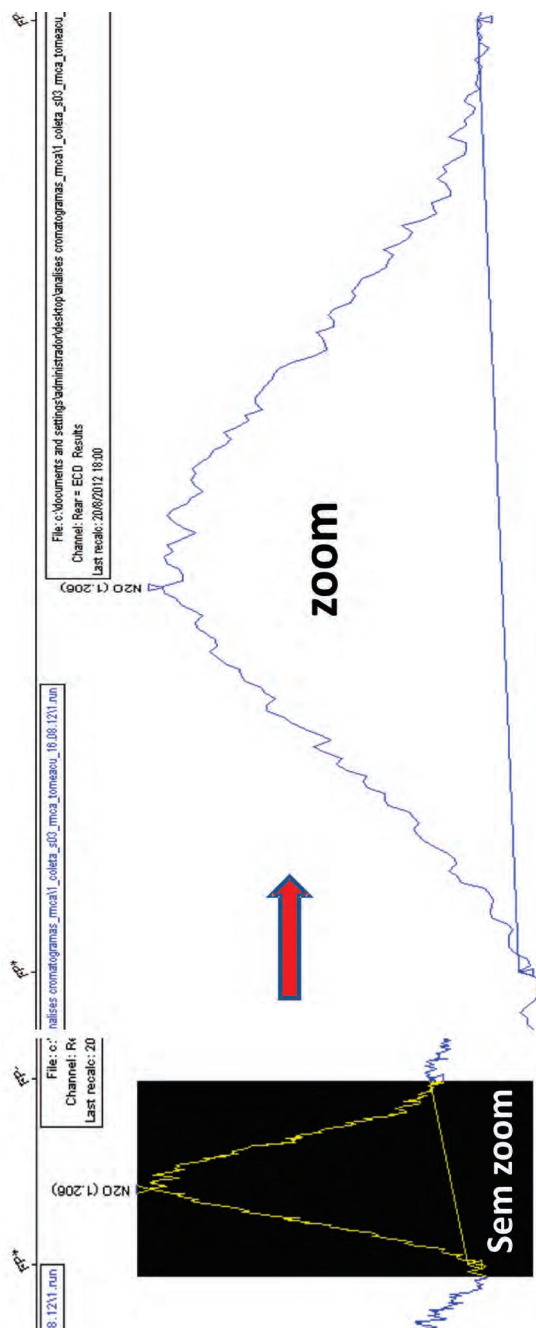


Figura 43. Comandos operacionais da função zoom.

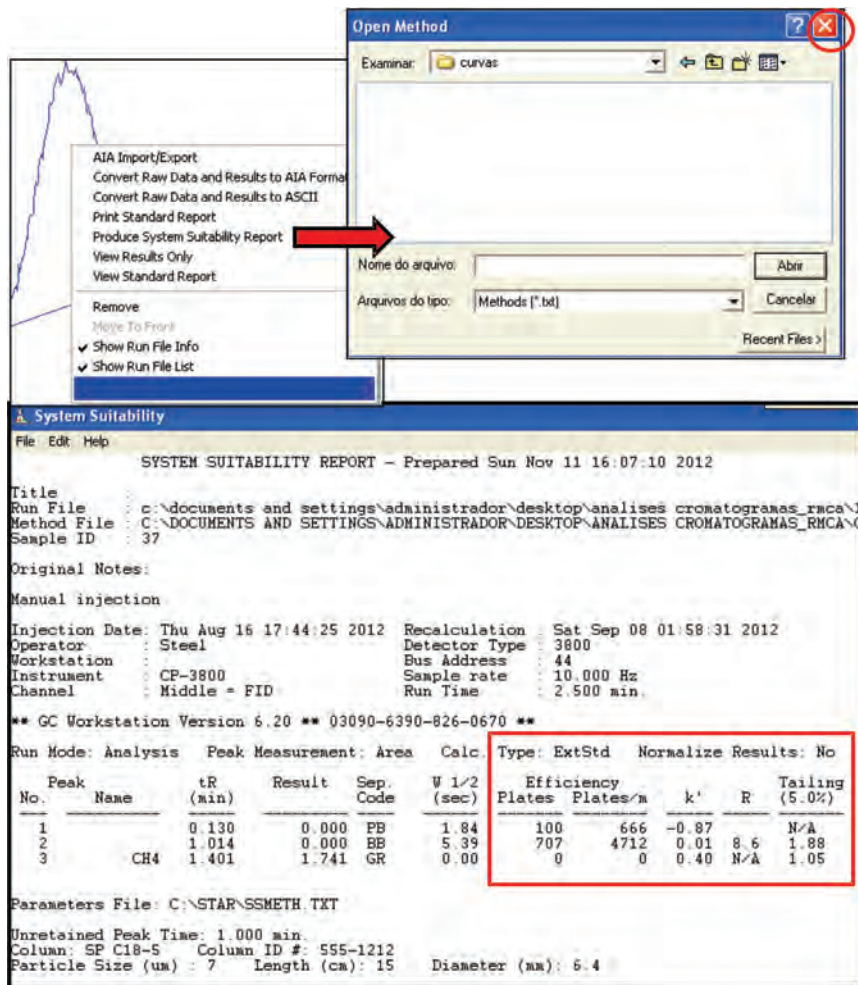


Figura 44. Comandos para abrir a função *Produce System Suitability Report*.

Cálculos de concentração no Excel

Para calcular a concentração das amostras no Excel, deve-se obter os resultados de área e os valores de concentração dos padrões analisados na corrida de amostra. Os padrões analíticos possuem valores conhecidos, o que permite o cálculo de inclinação e interceptação (coeficientes a e b) da reta de regressão.

Como funciona no Excel

Os coeficientes da reta de regressão (inclinação e interseção) são utilizados para calcular a concentração do analito (Figura 45).

- **Concentração** = $(\text{Área} - \beta) / \alpha$

* Onde: **Área** é a área do pico integrado; **β** representa o coeficiente linear da reta de regressão (a interseção em **y**, ou seja, é o valor que **y** assume quando **x** for zero); **α** representa o coeficiente angular (é a inclinação da reta, mede o aumento ou redução em **y** para cada aumento de uma unidade em **x**) da reta de regressão.

VETOR	y	y	x	x
PADRÃO	ÁREAN2O	ÁREACH4	Padrão Δ N2O	Padrão Δ CH4
A	14811	1639	0,34	1,96
A001	13766	1442	0,34	1,96
A002	10499	1419	0,34	1,96
B	30147	995	0,810	0,984
B001	31855	863	0,810	0,984
B002	31726	878	0,810	0,984
C	48284	2143	1,32	3,07
C001	50857	2342	1,32	3,07
C002	50355	2258	1,32	3,07

coeficientes	N2O	CH4
α	37542,1396	641,0576056
β	456,97174	268,1154088

**COEFICIENTE α =
INCLINAÇÃO (Y; X)**

**COEFICIENTE β =
INTERCEPTAÇÃO (Y; X)**

Figura 45. Tabela para cálculos dos coeficientes da reta de regressão.

Possíveis problemas

Erro de integração

Antes de integrar os cromatogramas é preciso ativar o método, pois dessa forma o programa de automação vai se basear na curva padrão, facilitando para o operador a visualização do início do sinal. Recomenda-se ter um parâmetro para integrar todos os picos de uma análise (Figura 46).

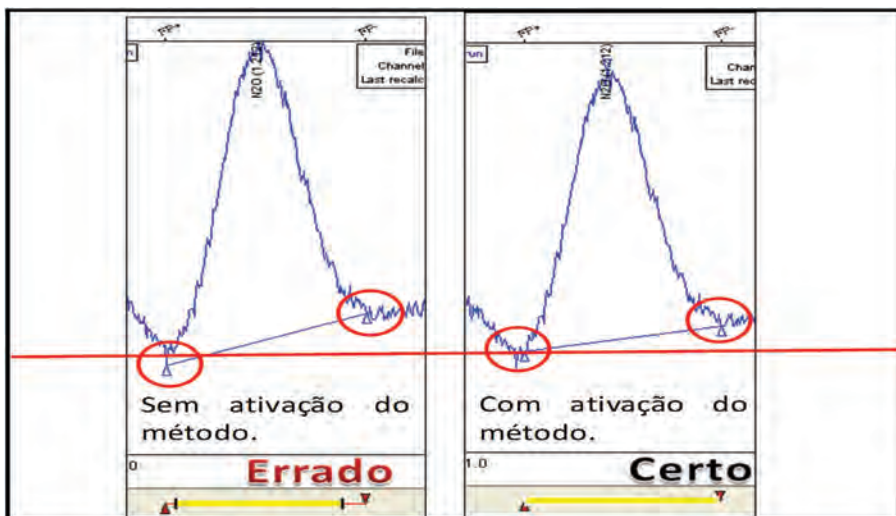


Figura 46. Procedimentos de integração cromatográfica.

- Deriva na linha de bases (*Drift*)

Pode ocorrer em razão da volatilização da FE líquida ou alternância de corrente elétrica (Figura 47). Não interfere diretamente no resultado, porém pode degradar componentes do aparelho, como a coluna cromatográfica.

- Ruídos em cromatogramas

Os ruídos podem ocorrer em decorrência de vazamentos no sistema, entrada de ar ou umidade no sistema, frascos de coleta contaminados ou sujos, septos dos frascos com vazamento (Figuras 48 e 49).

Tais problemas levam ao descarte da amostra analisada por erro de resultado de área e, consequentemente, de concentração.

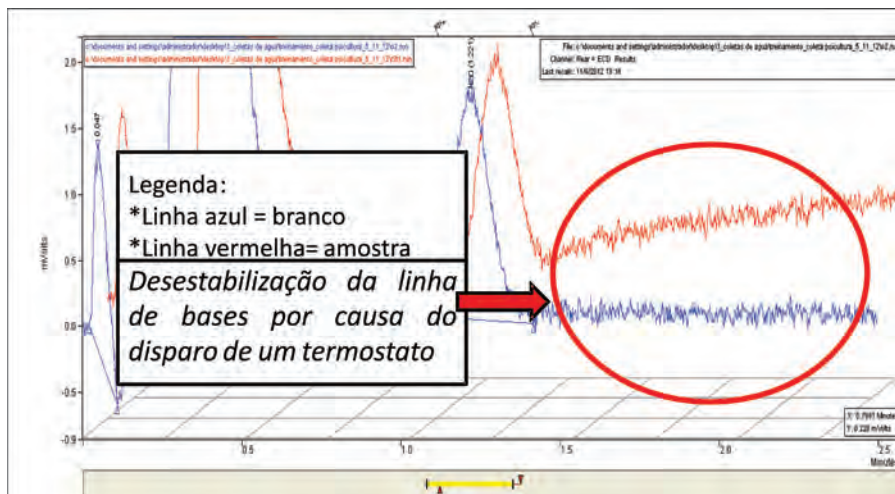


Figura 47. Demonstração de ocorrência de *Drift*.

Procedimentos de segurança importantes antes da coleta

- **Organização e limpeza do material de coleta:** o material de coleta (frascos de coleta de amostras, septos, seringas, agulhas, bomba de vácuo, termômetros, pilhas, régua de mensuração, etc.) em laboratório deve passar por limpeza e monitoramento para substituição (se necessário).
- **Pesagem dos frascos:** efetuar pesagem em balança analítica em laboratório até a estabilização (segurança de não entrada de ar e integridade de septo).
- **Verificação da bomba de vácuo:** deve-se verificar a eficiência da pressão da bomba de vácuo e possíveis impurezas na mangueira e agulha.
- **Limpeza dos frascos e seringas:** colocar os frascos em solução não eletrolítica por 24 horas, posteriormente, efetuar dois enxagues de lavagem e calcinação em mufla (500 °C/ 6 horas) para eliminação de compostos orgânicos.
- **Eliminação de fatores de umidade:** deve-se manter os frascos em estufa 65 °C até serem fechados e monitorados em estabilização de peso.

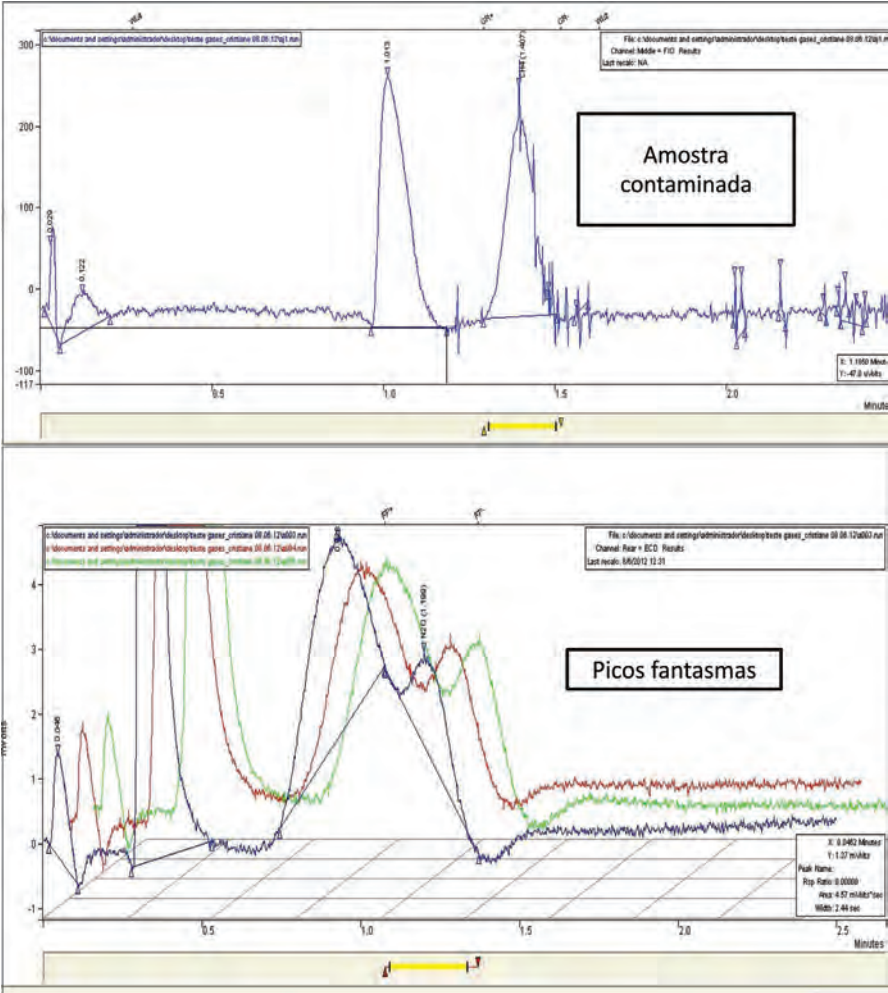


Figura 48. Exemplos de cromatogramas com ruídos.

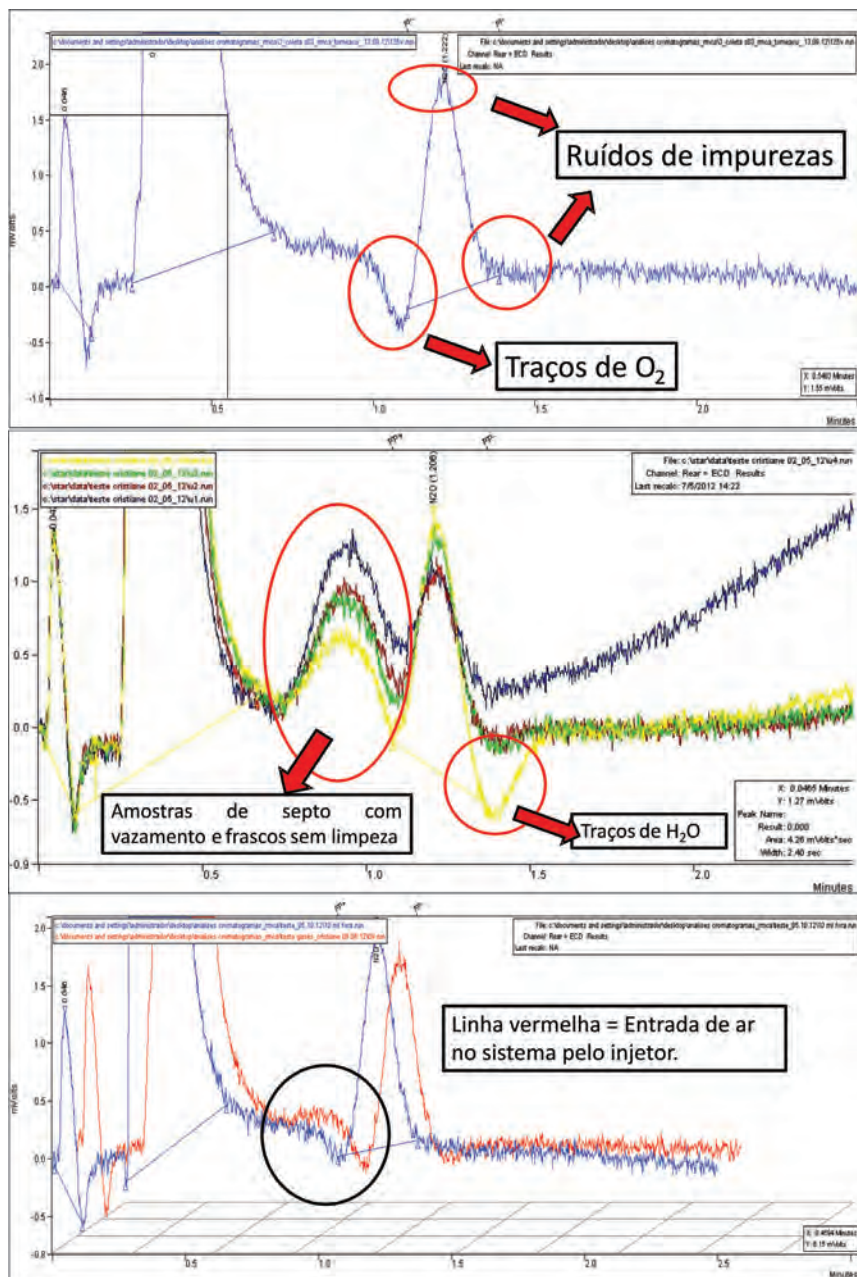


Figura 49. Cromatogramas prejudicados por ocorrência de impurezas e ruídos.

Coleta de amostras em campo

Para a determinação do fluxo de gás, as câmaras devem ser instaladas 24 horas antes da coleta, com auxílio de um nível de pedreiro, suporte de madeira e porrete para fincar as bases no chão sem danificar. Se ocorrer presença de material vegetal vivo no local de instalação das câmaras, deve-se cortar na base do coleto da plântula sem danificar a raiz o que for encontrado na parte interna da câmara com uma tesoura (para não comprometer os espaços porosos do solo em avaliação). É necessário vedar a parte externa da lateral das bases das câmaras com solo compactado e não alterar o sistema instalado após o final do processo.

As coletas são realizadas 0, 10, 20 e 30 minutos após colocação da cúpula sobre as bases em seringas de polipropileno de 20 ml. Posteriormente, no momento da coleta, as amostras são transferidas para frascos de borosilicato de 14 ml com septos vacutainer. Antes da transferência das amostras, em campo, deve ser feito vácuo com uma bomba de vácuo manual em todos os frascos de coleta e o material amostrado tem que ser colocado sobre pressão nos frascos de coleta.

Os frascos precisam ser conduzidos refrigerados ($\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ao laboratório em que os teores de concentração dos gases serão quantificados.

Para monitoramento do experimento, é necessário coleta de dados de pluviometria local, temperatura do solo com termômetros de solo analógico, umidade e temperatura atmosférica com psicrômetro e umidade atual do solo (profundidade = 0–10 cm).



Amazônia Oriental

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



CGPE 11260